

ALESSANDRA MACHADO BARON

**BIOCATÁLISE EM AMBIENTES AQUO-RESTRITOS: COMPARAÇÃO  
DE DIFERENTES SISTEMAS REACIONAIS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química Orgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nadia Krieger

CURITIBA

2003

# TERMO DE APROVAÇÃO

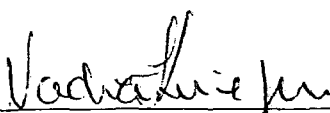
## **BIOCATÁLISE EM AMBIENTES AQUO RESTRITOS: COMPARAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS REACIONAIS**

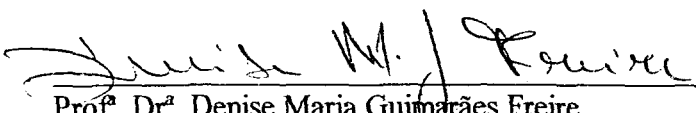
por

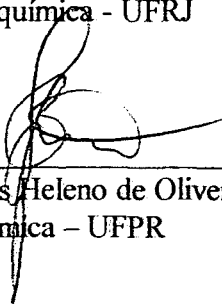
**ALESSANDRA MACHADO BARON**

Dissertação aprovada como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,  
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Nadia Krieger  
Deptº de Química – UFPR

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Denise Maria Guimarães Freire  
Deptº de Bioquímica - UFRJ

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira  
Deptº de Química – UFPR

Curitiba, 05 de junho de 2003.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela saúde.

À professora Nadia Krieger, por sua orientação, esclarecimento de dúvidas, apoio, resolução de problemas e pela amizade.

Ao Mario Baiogori, pela orientação e amizade, durante o trabalho desenvolvido na PROIMI (Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos).

Ao professor Luiz Pereira Ramos, do Departamento de Química da UFPR, pelo interesse na resolução de problemas e na escolha de novas alternativas, e colaborações técnicas.

À professora Maria Rita Sierakowski, do Departamento de Química da UFPR, por colaborações.

Ao Orlando, pelo amor, companheirismo, paciência, apoio e idéias.

A todos meu familiares, pelo carinho e incentivo (psicológico e financeiro), especialmente aos meus pais Celso e Neusa responsáveis pela minha formação.

Aos amigos de laboratório, Valéria, Maria Luiza, Fernanda, Danyella, Sirley, Gisela, Thaís, Marcelo, Leonardo e Joel pela amizade, pelo bom ambiente de trabalho, idéias e agradáveis momentos de conversa.

A todos meus amigos, em especial à Sandrinha, Luciana e Lilian pelo incentivo e amizade.

À Aline, por ter iniciado o estudo com o fungo *Penicillium corylophilum*.

À pesquisadora Maria Inez de Moura Sarquis (FIOCRUZ-RJ) que realizou a caracterização morfológica do microrganismo utilizado neste trabalho.

À professora Eleonora M. G. Vasconcelhos, do Departamento de Geologia da UFPR, pela orientação na obtenção da imagem do microrganismo.

À professora Ana Mercê, do departamento de Química da UFPR, pela doação da  $\beta$ -ciclodextrina.

A todos os professores do programa de Pós-graduação, por colaborarem com minha formação.

À CAPES, pelo suporte financeiro durante o período de três meses em que foi possível desenvolver parte deste trabalho na PROIMI.

À Mariela e família, pelo apoio durante o desenvolvimento do trabalho na PROIMI, tornando-me possível ganhar uma grande amiga.

Aos colegas da PROIMI, Lici, Luciana, Patrícia, Maria Ines, Ana, Lurdes, Karina, Emílio, Eduardo, Carlos e Sebastian.

Existe quem é capaz de instruir muitas pessoas, mas é inútil para si mesmo. Existe quem ostenta sabedoria em palavras, mas é detestado e acaba morrendo de fome. Porque o Senhor não lhe concede sua graça, ele fica desprovido de qualquer sabedoria. Existe quem é sábio só para si, e os frutos seguros de sua inteligência estão em sua própria boca. O homem sábio instrui o seu povo. Todos podem confiar nos frutos de sua inteligência. O homem sábio é cumulado de bênçãos, e é proclamado feliz por todos que o vêem.

(Ecl. 37, 19-24)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	iv
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	viii
<b>LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....</b>	ix
<b>RESUMO.....</b>	x
<b>ABSTRACT.....</b>	xi
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	4
2.1. Lipases.....	5
2.2. O Fenômeno da Ativação Interfacial.....	7
2.3. Especificidade.....	8
2.4. Produção de Lipases Fúngicas.....	9
2.4.1. Tipos de Fermentação.....	9
2.4.2. Produção de Lipases.....	10
2.4.3. Produção de Lipases por Fungos do Gênero <i>Penicillium</i> .....	12
2.5. Aplicações Biotecnológicas das Lipases.....	14
2.5.1. Indústria de Detergentes.....	14
2.5.2. Indústria Alimentícia.....	14
2.5.3. Indústria de Papel e Polpa.....	15
2.5.4. Indústria Oleoquímica.....	15
2.5.5. Indústria Farmacêutica.....	16
2.5.6. Síntese Orgânica.....	16
2.5.7. Biorremediação.....	18
2.6. Biocatálise em Meio Orgânico.....	18
2.6.1. Fatores que Influenciam a Biocatálise em Meio Orgânico.....	19
2.6.1.1. Água.....	19
2.6.1.2. Solvente.....	20
2.6.1.3. pH e Alteração da Especificidade Enzimática .....	21
2.6.2. Vantagens e Desvantagens da Biocatálise em Meio Aquo-Restrito.....	22
2.6.3. Sistemas Reacionais Aquo-Restritos.....	23
2.6.3.1. Sistemas Macro-Heterogêneos.....	23
2.6.3.1.1. Sistemas Bifásicos .....	23
2.6.3.1.2. Sistemas Trifásicos .....	25
2.6.3.2. Sistemas Micro-Heterogêneos.....	25
2.6.3.3. Enzimas Imobilizadas.....	26
2.6.3.4. Enzimas Encapsuladas em Micelas Reversas .....	29
2.6.3.4.1. Vantagens e Desvantagens da Utilização do Sistema de Micelas Reversas em Catálise Enzimática .....	31
2.6.3.4.2. Fatores que Influenciam na Biocatálise em Micelas Reversas.....	31
2.6.3.4.3. Relação entre $W_o$ e Atividade de Água ( $a_w$ ).....	34
2.6.4. Reações de Esterificação Catalisadas por Lipases em Meios Aquo-Restritos.....	34
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	37
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	39
4.1. Reagentes.....	40
4.2. Microrganismo .....	40
4.3. Enzimas.....	40
4.4. Preservação da Cepa.....	40

4.5. Esterilização dos Meios.....	41
4.6. Composição dos Meios.....	41
4.7. Condições de Cultivo.....	41
4.8. Cinética de Crescimento do Microrganismo.....	42
4.8.1. Determinação da Biomassa Fúngica.....	43
4.8.2. Produtividade Volumétrica da Enzima.....	43
4.9. Obtenção do Extrato Bruto.....	43
4.10. Caracterização do Extrato Lipolítico.....	44
4.10.1. Reações em Meio Aquoso.....	44
4.10.1.1. Estabilidade à Liofilização.....	45
4.10.1.2. Liofilização em Presença de $\beta$ -Ciclodextrina.....	45
4.10.1.3. Liofilização em Presença de Cloreto de Potássio.....	45
4.10.1.4. Efeito do pH.....	45
4.10.1.5. Efeito da Temperatura.....	46
4.10.1.6. Estabilidade à Temperatura.....	46
4.10.2. Atividade Enzimática Frente a Diferentes Substratos e Sistemas.....	46
4.10.3. Reações de Esterificação em Meio Aquo-Restrito.....	46
4.10.3.1. Liofilização do Extrato Bruto.....	47
4.10.3.2. Imobilização Enzimática.....	47
4.10.3.3. Encapsulamento em Micelas Reversas.....	48
4.11. Estudos de Estabilidade em Solventes Orgânicos.....	49
4.11.1. Estabilidade em Solventes Polares .....	49
4.11.2. Estabilidade em Solvente Apolares em Diferentes $a_w$ .....	49
4.12. Condições Reacionais para as Reações de Hidrólise e Esterificação em Meio Aquo-Restrito .....	50
4.13. Métodos Analíticos.....	51
4.13.1. Dosagem de Atividade Lipolítica em Meio Aquoso .....	51
4.13.1.1. Hidrólise do pNPP.....	51
4.13.1.2. Método Titulométrico.....	52
4.13.2. Dosagem de Atividade em Meio Orgânico.....	52
4.13.2.1. Método de Lowry-Tinsley .....	52
4.13.2.2. Método do pNPP.....	53
4.13.3. Determinação de Proteínas.....	53
4.13.4. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	53
4.13.5. Análise em CLAE.....	54
4.13.6. Análises Termogravimétricas.....	54
4.13.7. Análises em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	54
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
5.1. Estudos de Produção de Lipases por <i>Penicilium corylophilum</i> .....	56
5.2. Caracterização do Extrato Lipolítico-Fatores que Influenciam na Atividade Lipolítica em Meio Aquoso.....	59
5.2.1. Estabilidade do Extrato Lipolítico à Liofilização.....	59
5.2.1.1. Liofilização do Extrato Lipolítico com $\beta$ -Ciclodextrina.....	60
5.2.1.2. Liofilização do Extrato Lipolítico com Cloreto de Potássio.....	61
5.2.2. Efeito do pH na Atividade Lipolítica.....	62
5.2.3. Efeito da Temperatura na Atividade Lipolítica.....	63
5.2.4. Estabilidade à Temperatura.....	64
5.3. Estudos de Estabilidade em Solventes Polares e Apolares.....	65
5.4. Comparação da Atividade em Meio Aquoso e Sistema Micelar.....	68
5.5. Esterificação em Sistemas Aquo-Restritos.....	69

5.5.1. Sistema de Micelas Reversas.....	70
5.5.2. Sistema Macro-Heterogêneo n-Heptano/Enzima Liofilizada.....	72
5.5.2.1. Quantificação da Atividade de Água no Extrato Lipolítico.....	73
5.5.3. Sistema Macro-Heterogêneo n-Heptano/Enzima Liofilizada com $\beta$ -Ciclodextrina.....	75
5.5.4. Sistema Macro-Heterogêneo n-Heptano/Enzima Imobilizada.....	76
5.5.4.1. Ensaio de Imobilização.....	76
5.5.4.1.1. Cinética de Imobilização.....	77
5.5.4.1.2. Parâmetros do Processo de Imobilização: Eficiência e Rendimento.....	77
5.5.4.1.3. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	78
5.5.4.2. Esterificação com a Enzima Imobilizada.....	80
5.5.5. Comparação dos Sistemas Aquo-Restritos.....	82
5.5.5.1. Discussão dos Resultados Referentes à Comparação dos Diferentes Sistemas Reacionais.....	85
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
<b>7. ETAPAS FUTURAS.....</b>	<b>93</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>95</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Mecanismo catalítico de lipases. Fonte: Jaeger *et al.* (1994).

**Figura 2.** Ativação interfacial das lipases. Concentração de substrato no ponto 1.0 corresponde ao ponto de saturação do substrato. a) curva de substrato para lipase; b) curva de substrato para esterase. Fonte: Sarda e Desnuelle (1958).

**Figura 3.** Fungo *Penicillium corylophilum* Dierckx IOC 4211. imagem obtida em microscópio petrográfico binocular Olympus e digitalizada pelo programa Image Pro. Plus 2.0. aumento de 400 vezes. O microrganismo foi repicado em meio BDA e mantido a 29 °C por 7 dias. Fonte: Fernandes (2001a).

**Figura 4.** Representação da síntese enantiosseletiva do ácido 2-fenil-propanóico (intermediário do Ibuprofeno).

**Figura 5.** Esquema das reações de síntese: esterificação, interesterificação e transesterificação catalisadas por lipases. Fonte: Villeneuve *et al.* (2000).

**Figura 6.** Sistemas de controle de  $a_w$ : a) adição direta do sal hidratado no meio reacional b) pré-equilíbrio (individualmente) do substrato, solvente e do biocatalisador. Fonte: Kvittingen (1994).

**Figura 7.** Representação esquemática de um sistema reacional macro-heterogêneo bifásico (líquido-líquido). A fase líquida orgânica ( ) é constituída pela solução de substrato num solvente orgânico apolar e a fase líquida aquosa (□) contém a enzima (●). Fonte: Gonçalves (1999).

**Figura 8.** Representação esquemática de um sistema reacional macro-heterogêneo bifásico (sólido-líquido). (a) biocatalisador imobilizado (●) ressuspensão em meio orgânico; (b) biocatalisador liofilizado (⊙) e na forma de cristais, ressuspensão em meio orgânico. A fase líquida orgânica ( ) é constituída pela solução de substrato num solvente orgânico apolar. Fonte: Gonçalves (1999).

**Figura 9.** Representação da imobilização através de (a) ligação covalente. A enzima representada pela esfera está na forma “fechada”; (b) através de adsorção. A enzima representada pela esfera está na forma “aberta”. Fonte: Palomo *et al.* (2002).

**Figura 10.** Representação esquemática de uma micela reversa, na qual a enzima ocupa a parte central da micela. Fonte: Carvalho e Cabral (2000).

**Figura 11.** Surfactante dioctilsulfosuccinato de sódio (AOT). Fonte: Carvalho e Cabral (2000).

**Figura 12.** Relação entre  $[H_2O]/[AOT]$  ( $W_0$ ) e atividade de água ( $a_w = p_w / p_w^\circ$ ). Fonte: Crooks *et al.* (1995).



**Figura 13.** Fungo *Penicillium corylophilum* em meio BDA. Crescimento após 7 dias, a 29 °C.

**Figura 14.** Repique do fungo *Penicillium corylophilum* em tubo inclinado (meio de crescimento, BDA). Tempo de crescimento: 7 dias.

**Figura 15.** Representação da reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila.

**Figura 16.** Estrutura do complexo formado entre o íon  $\text{Cu}^{2+}$  e os ácidos graxos livres em solução.

**Figura 17.** Produção de lipases por *Penicillium corylophilum*. Condições: Meio 1 (♦), solução de sais, extrato de levedura, peptona de carne e 1 % de óleo de oliva. Meio 2 (■), solução de sais, glucose e 2 % de óleo de oliva. Agitação de 120 rpm e 29 °C.

**Figura 18.** Imagem dos *pellets* produzidos por *Penicillium corylophilum* em meio de cultivo: (a) 1 (fontes orgânicas) e (b) 2 (meio basicamente formado por sais).

**Figura 19.** Cinética de crescimento microbiano durante cultivo para produção de lipase por *Penicillium corylophilum* Dierckx IOC 4211. (a) pH; (b) atividade específica ( $\text{U.mg}^{-1}$ ); (c) atividade lipolítica volumétrica ( $\text{U.mL}^{-1}$ ); (d) Biomassa ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ).

**Figura 20.** Influência do tempo de liofilização na atividade enzimática. Condições do ensaio na dosagem da atividade em pNPP: 37 °C, tampão fosfato pH 7,0, 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ .

**Figura 21.** Estrutura química da  $\beta$ -ciclodextrina. Fonte: Thammarat e Narongsak (2003).

**Figura 22.** Atividade do extrato lipolítico liofilizado com diferentes concentrações de KCl. Condições do ensaio na dosagem da atividade em pNPP: meio aquoso, 37 °C, tampão fosfato pH 7,0, 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ .

**Figura 23.** Efeito do pH na atividade lipolítica do extrato enzimático precipitado. Condições de ensaio: Dosagem pelo método do pNPP, meio aquoso; tampões (■) citrato-fosfato pH 5,0 e 6,0; (●) fosfato pH 6,0, 7,0 e 8,0; (▲) Tris-HCl pH 8,0 e 9,0; (▼) carbonato-bicarbonato pH 9,0 e 10,0, todos 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ ; concentração de proteína 0,0097  $\text{mg.mL}^{-1}$  para o fosfato pH 8,0 e 0,013  $\text{mg.mL}^{-1}$  para os demais.

**Figura 24.** Efeito da temperatura na atividade lipolítica do extrato enzimático. Condições de ensaio: Dosagem pelo método do pNPP, meio aquoso, tempo de reação 1 min. Concentração de proteínas 0,013  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

**Figura 25.** Estabilidade do extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum* à temperatura. O extrato bruto foi incubado 30 min a 37 °C; 40 °C; 50 °C e 60 °C. Atividade residual medida através da hidrólise do pNPP em meio aquoso.

**Figura 26.** Estabilidade do extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum* em solventes polares. Condições: Porcentagens em solventes 10 % (■); 20 % (■); 30 % (■); 40 % (■); 50 % (■). Tempo de incubação da enzima em presença do solvente: 30 min a 37 °C. Atividade residual medida através da hidrólise do pNPP em meio aquoso.

**Figura 27.** Estabilidade do extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum* em solventes apolares. Atividade de água ( $a_w$ ): 0,11 (■); 0,53 (■); 0,95 (■). Tempo de incubação da enzima em presença do solvente: 30 min a 37°C. Atividade residual medida pelo método do pNPP em meio aquoso.

**Figura 28.** Cinética da reação de síntese do oleato de n-butila, catalisada por extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum* em micelas reversas AOT 100 mmol.L<sup>-1</sup>/n-heptano.  $W_0$  5 (○);  $W_0$  10 (■);  $W_0$  15 (□). Condições: concentração de proteínas 0,38 mg.mL<sup>-1</sup>, 37 °C.

**Figura 29.** Cinética da reação de síntese do oleato de n-butila, catalisada por extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum*. Sistema macro-heterogêneo n-heptano/enzima liofilizada,  $a_w$  0,11 (●);  $a_w$  0,5 (○);  $a_w$  0,95 (□). Condições: concentração de proteínas 0,38 mg.mL<sup>-1</sup>, 37 °C.

**Figura 30.** Termograma (TGA) para extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum* em diferentes  $a_w$ : 0,11; 0,5 e 0,95 (1, 2 e 3 respectivamente). A porcentagem de água (m/m) foi calculada a 156 °C. Condições: 40 mg do extrato lipolítico liofilizado, atmosfera de O<sub>2</sub> e gás de arraste N<sub>2</sub>, ambos a 100 mL.min<sup>-1</sup>; aquecimento de 20 a 300 °C e gradiente de temperatura de 10 °C. min<sup>-1</sup>.

**Figura 31.** Termograma (DTA) para extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum* liofilizado em diferentes  $a_w$ : 0,11; 0,5 e 0,95 (1, 2 e 3 respectivamente). A energia, correspondente à reação endotérmica (μV.mg<sup>-1</sup>) foi avaliada em 156 °C. Condições: 40 mg do extrato lipolítico liofilizado, atmosfera de O<sub>2</sub> e gás de arraste N<sub>2</sub>, ambos a 100 mL.min<sup>-1</sup>; aquecimento de 20 a 300 °C e gradiente de temperatura de 10 °C. min<sup>-1</sup>.

**Figura 32.** Cinética da reação de síntese do oleato de n-butila, catalisada por extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum*. Sistema macro-heterogêneo n-heptano/enzima liofilizada com β-ciclodextrina,  $a_w$  0,11. Condições: concentração de proteínas 0,38 mg.mL<sup>-1</sup>, 37 °C.

**Figura 33.** Cinética de imobilização das lipases de *Penicillium corylophilum* em *Octyl Sepharose*. Atividade residual no sobrenadante determinada pelo método do pNPP, em meio aquoso.

**Figura 34.** Fotomicrografia do suporte *Octyl Sepharose* antes da imobilização enzimática. Aumento a) 1640 b) 3280 vezes.

**Figura 35.** Fotomicrografia do suporte *Octyl Sepharose* após imobilização enzimática. Aumento a) 1640 b) 3280 vezes.

**Figura 36.** Modelo de adsorção de lipase (figura em preto) sobre géis hidrofóbicos. Fonte: Reetz e Jaeger, 1998.

**Figura 37.** Cinética da reação de síntese do oleato de n-butila, catalisada por extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum*, imobilizado em *Octyl Sepharose*. Sistema macro-heterogêneo n-heptano/enzima imobilizada  $a_w$  0,11. Condições: concentração de proteínas 0,38 mg.mL<sup>-1</sup>, 37 °C.

**Figura 38.** Fotomicrografia do suporte *Octyl Sepharose* após reação de esterificação do oleato de n-butila em n-heptano,  $0,38 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $37^\circ\text{C}$ . Aumento (a) 1640 (b) 3280 vezes.

**Figura 39.** Comparação dos sistemas na cinética da reação de síntese do oleato de n-butila, catalisada por extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum*. Sistema de micelas reversas  $W_0$  10 (●); n-heptano/enzima liofilizada,  $a_w$  0,11 (■); n-heptano/enzima liofilizada com  $\beta$ -ciclodextrina,  $a_w$  0,11 (o) e n-heptano/enzima imobilizada em *Octyl Sepharose*,  $a_w$  0,11 (□). Concentração de proteínas em todos os sistemas foi mantida constante em  $0,38 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

**Figura 40.** Cromatograma da amostra resultante da esterificação do oleato de n-butila em micelas reversas AOT/n-heptano catalisada pelo extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum*. Condições da reação: 12 h,  $0,38 \text{ mg.mL}^{-1}$  de proteínas no meio reacional,  $W_0$  10,  $37^\circ\text{C}$ . CLAE: fase móvel acetonitrila: acetona (9:1),  $0,9 \text{ mL.min}^{-1}$ ,  $40^\circ\text{C}$  e detector de índice de refração, 6 min pico referente ao éster.

**Figura 41.** Cromatograma das amostras resultante da esterificação do oleato de n-butila em sistema macro-heterogêneo n-heptano/enzima liofilizada. Condições da reação: 12 h,  $0,38 \text{ mg.mL}^{-1}$  de proteínas no meio reacional,  $a_w$  0,11,  $37^\circ\text{C}$ . CLAE: fase móvel acetonitrila: acetona (9:1),  $0,9 \text{ mL.min}^{-1}$ ,  $40^\circ\text{C}$  e detector de índice de refração, picos em 4 min e 6 min referentes ao ácido e ao éster respectivamente.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Reações de esterificação catalisadas por lipases em diferente meios orgânicos.

**Tabela 2.** Composição dos meios de cultivo.

**Tabela 3.** Temperatura ótima para a atividade de algumas lipases de *Penicillium*.

**Tabela 4.** Valores de log P para os solventes empregados no estudo da estabilidade enzimática. Fonte: Lima e Angnes (1999).

**Tabela 5.** Reações de hidrólise de ésteres com o extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum*. Condições do ensaio: Meio aquoso (1): 37°C, tampão fosfato pH 7,0, 50 mmol.L<sup>-1</sup>, 0,10 % de goma arábica e 0,40 % de Triton X-100. (2) (somente com a Trioleína): 37 °C, 60 % de tampão fosfato pH 7,0, 50 mmol.L<sup>-1</sup>, 20 % de trioleína e 20 % de Triton X-100. Meio micelar 37 °C, tampão fosfato pH 7,0, 50 mmol.L<sup>-1</sup>, (AOT 100 mmol.L<sup>-1</sup>/n-heptano). W<sub>0</sub> 15.

**Tabela 6.** Reações de síntese de ésteres catalisadas por lipases em sistemas de micelas reversas.

**Tabela 7.** Parâmetros da Imobilização das lipases de *Penicillium corylophilum* no suporte hidrofóbico *Octyl Sepharose*.

**Tabela 8.** Reações de síntese de ésteres catalisadas por lipases: comparação de sistemas reacionais orgânicos. Sendo: l-l: líquido-líquido; s-l: sólido-líquido.

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

AOT- bis-2-etil-hexil-sulfossuccinato de sódio. dioctilsulfossuccinato de sódio  
BSA- soro-albumina bovina  
 $a_w$ - atividade de água.  $(n_1/n_1 + n_2)$ ;  $a_w = p_w / p_w^\circ$   
CCD- cromatografia de camada delgada  
CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência  
CMC- concentração micelar crítica  
CTBA- Brometo de cetiltrimetilamônio  
Da- dalton  
Glu- ácido glutâmio  
His- Histidina  
log P- logaritmo do coeficiente de partição num sistema bifásico padrão octanol/água  
m/v- massa, volume  
 $\mu$ - taxa específica de crescimento ( $h^{-1}$ )  
 $n_1$ - número de mols do solvente  
 $n_2$ - número de mols do soluto  
pNPA- p- nitrofenilacetato  
pNPB- p- nitrofenilbutirato  
pNPC- p- nitrofenilcaproato  
pNPP- p- nitrofenilpalmitato  
 $p_w$ - pressão de vapor da água  
 $p_w^\circ$ - pressão de vapor da água pura  
rpm- rotações por minuto  
S- Substrato  
Ser- Serina  
 $t_d$ - Tempo de duplicação (h)  
U- Unidade internacional de atividade ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ )  
v/v- volume, volume  
 $W_0$ - Razão molar das concentrações de água e tensioativo (water-in-oil)

## RESUMO

As lipases fazem parte da classe de hidrolases, cuja classificação internacional é “glicerol éster hidrolases E.C. 3.1.1.3”. De origem bacteriana, fúngica ou de mamíferos e propriedades diversas, estas enzimas podem catalisar a hidrólise e a síntese de um grande número de compostos em diferentes meios e condições reacionais. O objetivo deste trabalho foi estudar a biocatálise em sistemas bifásicos micro-heterogêneos e macro-heterogêneos, utilizando o extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum* (IOC 4211). Para tanto, foram estudadas a reação de hidrólise de ésteres em meio aquoso e em micelas reversas AOT/n-heptano, bem como, a síntese do oleato de n-butila no sistema micro-heterogêneos (micelas reversas) e em sistemas macro-heterogêneos (bifásicos). Foi estudada a eficiência de várias preparações enzimáticas nos sistemas, usando n-heptano como meio reacional, a saber: 1) adição direta da enzima liofilizada; 2) adição direta da enzima co-liofilizada com  $\beta$ -ciclodextrina e 3) adição da enzima imobilizada em gel hidrofóbico. Inicialmente, investigou-se a produção da enzima e as propriedades do extrato lipolítico, como o efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática, e a estabilidade da enzima à temperatura e em presença de solventes orgânicos. Verificou-se que a produção máxima da enzima foi de  $6,8 \text{ U.mL}^{-1}$ , após 144 h, a  $29^\circ\text{C}$  e agitação orbital de 120 rpm, em um meio composto por sais minerais, glucose e 2 % (v/v) de óleo de oliva. O extrato lipolítico apresentou maior atividade na faixa de pH entre 6,0 e 8,0, e na faixa de temperatura entre 45 e  $60^\circ\text{C}$ . As lipases contidas no extrato bruto não são termoestáveis, mas apresentam estabilidade quando incubadas em presença de solventes orgânicos apolares: de fato, quando o extrato lipolítico foi incubado em n-heptano, a enzima mostrou ativação de 14 e 30 % com atividade de água ( $a_w$ ) inicial no sistema de 0,53 e 0,95, respectivamente. As maiores atividades enzimáticas do extrato bruto de *P. corylophilum* foram encontradas para o pNPP em meio aquoso e para a trioleína em meio micelar. No meio aquoso foi observada ainda uma ativação da enzima de aproximadamente 7 vezes após a co-liofilização com  $\beta$ -ciclodextrina, e 2 vezes após a imobilização no gel hidrofóbico. Nas reações de esterificação, a reação modelo utilizada foi a síntese do oleato de n-butila. A síntese foi acompanhada por CCD e por CLAE, e os rendimentos foram determinados pelo método de Lowry-Tinsley. O melhor sistema para a síntese do oleato de n-butila foi de micelas reversas com  $W_0$  (teor de água) de 10 e 100 % de rendimento (12 h), seguido do sistema onde se adicionou a enzima liofilizada, com 100 % de rendimento (48 h) obtido com  $a_w$  inicial no meio reacional de 0,11. Para o sistema onde a enzima foi co-liofilizada com  $\beta$ -ciclodextrina, o rendimento foi de 63 % (48 h), em  $a_w$  inicial de 0,11. O sistema menos eficiente foi o que utilizou a enzima imobilizada em gel hidrofóbico, com 14 % (48 h) e  $a_w$  inicial de 0,11. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o extrato lipolítico de *P. corylophilum*, um fungo isolado localmente, pode ser utilizado em reações de síntese em meios aquo-restritos, e sugerem a importância da continuidade dos estudos no sentido de purificação e caracterização bioquímica das lipases produzidas por *P. corylophilum*, e uma investigação em profundidade do potencial de uso das enzimas purificadas para a produção de compostos de química fina.

**Palavras-chave:** Lipases, *Penicillium corylophilum*, biocatálise, sistemas aquo-restritos, micelas reversas.



## ABSTRACT

Lipases belong to the class of hydrolases, and are classified as “glycerol ester hydrolases E.C. 3.1.1.3”. This group includes bacterial, fungal and mammalian enzymes with diverse characteristics, united by their ability to catalyze the hydrolysis and the synthesis of a large number of compounds in different reaction media and under different conditions. The objective of this work was to study biocatalysis in macro-heterogeneous and micro-heterogeneous biphasic systems, utilizing the lipolytic extract from *Penicillium corylophilum* (IOC 4211). The following aspects were studied: the hydrolysis of esters in aqueous solution and in AOT/n-heptano reversed micelles, and the synthesis of butyl oleate ester in a micro-heterogeneous system (reversed micelles), and in macro-heterogeneous systems (biphasic) systems. The performance of various enzyme preparations in these systems, using n-heptane as the reaction media, was studied: 1) direct addition of the lyophilized enzyme; 2) direct addition of the enzyme co-lyophilized with  $\beta$ -cyclodextrin and 3) addition of the enzyme immobilized on a hydrophobic support. The initial studies were undertaken to characterize the production of the enzyme and the properties of the lipolytic extract, such as the effect of pH and temperature on enzyme activity and the stability of the enzyme at elevated temperatures and in the presence of organic solvents. The maximum enzyme concentration obtained in the production studies was  $6.80 \text{ U.mL}^{-1}$ , after 144 h of incubation on a rotary shaker at  $29^\circ\text{C}$  and 120 rpm, in a medium containing mineral salts, glucose e 2 % (v/v) olive oil. The lipolytic extract showed greatest activity in the pH range 6.0-8.0 and in the temperature range  $45 - 60^\circ\text{C}$ . The lipases within the crude extract are not thermostable, but do show stability when incubated in the presence of organic apolar solvents: in fact, when the extract was incubated in n-heptane, the enzyme was activated by 14 to 30 % for an initial water activity of the system ( $a_w$ ) of 0,53 and 0,95, respectively. The highest activities measured for the crude lipolytic extract were for the hydrolysis of pNPP in aqueous solution and for the hydrolysis of triolein in the reversed micelle system. In aqueous solution the enzyme was activated approximately seven-fold after co-lyophilization with  $\beta$ -cyclodextrin, and approximately 2-fold after immobilization in hydrophobic gel. In the esterification reactions the model reaction used was the synthesis of butyl oleate ester, with the reaction being followed by TLC and HPLC, and the yields being determined by the Lowry-Tinsley method. The best system for the synthesis of butyl oleate ester was the reversed micellar system with a  $W_0$  (water content) of 10, which gave a yield of 100 % (12 h), followed by the system in which the enzyme lyophilized was added to the medium, with a yield of 100 % (48 h), obtained at an initial  $a_w$  of 0.11 in the reaction medium. For the system in which the enzyme was co-lyophilized with  $\beta$ -cyclodextrin, the yield was 63 % (48 h), also obtained at an initial  $a_w$  of 0.11. The least efficient system was the enzyme immobilized on hydrophobic gel, with a 14 % (48 h) yield, obtained at the same initial  $a_w$  of 0.11. The results obtained in this study show that the lipolytic extract of *P. corylophilum*, a locally-isolated fungus, can be used in synthesis reactions in low-water systems, and suggest that the studies should now proceed to the purification of lipases from the crude extract, the biochemical characterization of these lipases and an in-depth investigation of the potential for the use of purified enzymes in biocatalysis, for the production of fine chemicals.

**Palavras-chave:** Lipases, *Penicillium corylophilum*, biocatalysis, low-water systems, reversed micelles.

## **1. INTRODUÇÃO**

---



A utilização de enzimas na transformação de compostos orgânicos é conhecida há mais de cem anos (Costa *et al.*, 1999). Entretanto, foi somente a partir da segunda metade da última década que o verdadeiro potencial que estes biocatalisadores representam em síntese orgânica começou a ser explorado. Durante este período, um grande número de reações catalisadas por enzimas foi estudado e tornou-se familiar aos químicos orgânicos. Dentre as numerosas aplicações de reações enzimáticas em meio orgânico destacam-se a síntese de produtos de interesse nas áreas clínica, nutricional, ambiental, industrial e biotecnológica. Por exemplo, a) na indústria farmacêutica, a síntese de intermediários de produtos biologicamente ativos, como o naxopreno e ibuprofeno e a resolução de misturas racêmicas, como a síntese do Atenolol, medicamento usado no tratamento de hipertensão; b) na indústria de alimentos: síntese de aromas, síntese de aspartame e na maturação de queijos; c) na indústria de detergentes, para remoção de manchas de gordura dos tecidos; d) na agroquímica, inseticidas e pesticidas e e) na indústria óleoquímica, para a hidrólise e interesterificação regioseletiva de óleos e gorduras e síntese de biosurfactantes (Tan *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2002; Fukuda *et al.*, 2001; Krieger *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 1999; Vulson *et al.*, 1994).

Apesar do reconhecimento desses benefícios, o número de trabalhos onde enzimas têm sido utilizadas em meios não-aquosos ou aquo-restritos, composto por solvente orgânico, polar ou apolar e com teor de água mínimo  $a_w$ , entre 0,06 a 1, em sistemas microheterogêneos; (Persson *et al.*, 2002a) é ainda bastante limitado, quando comparado com a quantidade de monografias produzidas sobre estudos em fase aquosa. As principais razões que podem justificar tal desequilíbrio no uso de meios aquosos e não-aquosos estão relacionadas com o desconhecimento do comportamento de inúmeras enzimas em ambientes aquo-restritos. O ambiente natural e biológico das enzimas é o meio aquoso, sendo que os fundamentos da enzimologia em meio não-aquosos foram estabelecidos muito recentemente e mesmo assim, ainda resta muito a esclarecer (Klibanov, 2001; Lima e Angnes, 1999).

Entretanto, a utilização de sistemas de biocatálise em solventes orgânicos oferece vantagens, como a melhor solubilização de substratos hidrofóbicos, que é o caso de lipases, podendo mesmo causar uma ativação enzimática em relação ao meio aquoso (Knezevic *et al.*, 2002; Linko *et al.*, 1995). Esta e outras vantagens, bem como o esclarecimento do

comportamento de lipases em meios orgânicos justificaram a realização deste trabalho, cujo objetivo principal foi o estudo do comportamento de lipases em diferentes meios aquo-restritos.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

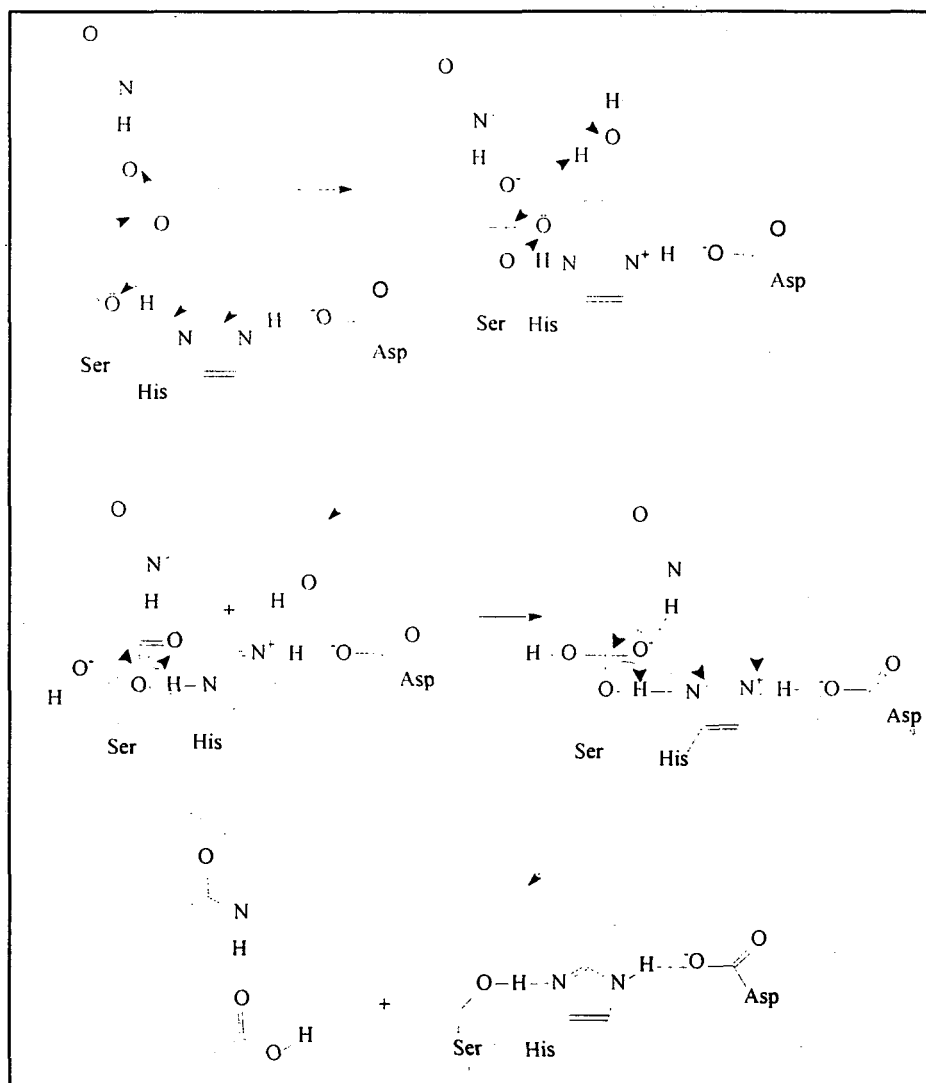
## 2.1. Lipases

Dentre as enzimas empregadas em síntese em ambientes aquo-restritos, inúmeras são as utilizadas, para diferentes propósitos. As lipases, ao lado de esterases e proteases, têm uma posição de destaque nestes meios reacionais, devido à gama de reações catalisadas por estas enzimas com baixo teor de água em sistemas orgânicos (esterificação, transesterificação, interesterificação e aminólise), estabilidade apreciável nestes ambientes e condições reacionais brandas. Inúmeras publicações estão descritas na literatura sobre diferentes aplicações e condições (Garcia *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 1999; Krieger *et al.*, 1997a; Watanabe *et al.*, 1995).

As lipases [glicerol éster hidrolases, (E.C. 3.1.1.3)] pertencem a um grupo de enzimas classificadas como serina hidrolases, constituídas pela tríade catalítica G-X<sub>1</sub>-S-X<sub>2</sub>-G, onde G= glicina; S= Serina; X<sub>1</sub>= histidina e X<sub>2</sub>= ácido glutâmico ou aspártico (Saxena *et al.*, 2002). A massa molecular das lipases se encontra normalmente entre 12 kDa (Bandmann *et al.*, 2000; Nagao *et al.*, 1996; Shimada *et al.*, 1993) a 69 kDa (Dharmsthiti e Luchai, 1999). Atuam sobre substratos insolúveis em água, em interfaces de lipídeo/água, hidrolisando, por exemplo, acilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono), seus substratos naturais, além de serem capazes de catalisarem reações de síntese, em ambiente aquo-restrito (Bornscheuer *et al.*, 2002; Jaeger *et al.*, 1994). O mecanismo catalítico para a hidrólise de um éster por lipases (Figura 1) segue o modelo proposto para a quimotripsina, uma protease, devido à semelhança estrutural entre o sítio de lipases e proteases. A histidina da “tampa hidrofóbica” aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina do sítio ativo catalítico. O oxigênio da hidroxila serínica provoca um ataque nucleofílico no carbono carbonílico da ligação éster da cadeia do substrato, formando um intermediário tetraédrico. O intermediário tetraédrico expulsa o íon alcóxido, e a partir da transferência de um próton de moléculas de água um dos produtos, o álcool, é formado. O íon hidróxido formado na etapa anterior ataca novamente o carbono carbonílico do resíduo ácido, originando outro intermediário tetraédrico (acil enzima). Este complexo por sua vez, libera o ácido carboxílico e a enzima é regenerada (Jaeger *et al.*, 1994).

Outras características das lipases como pH ótimo para atividade, podem variar muito: desde 2, como por exemplo para a lipase de *Kluyveromyces lactis* (Oishi *et al.*, 1999) até 10 para a lipase de *P. cyclopium* (Ibrik *et al.*, 1998); a temperatura ótima para

a atividade também pode variar desde 25 °C, para a lipase de *Alternaria brassicicola* (Berto *et al.*, 1997) até 90°C para a lipase de *Burkholderia cepacia* (Rathi *et al.*, 2000).



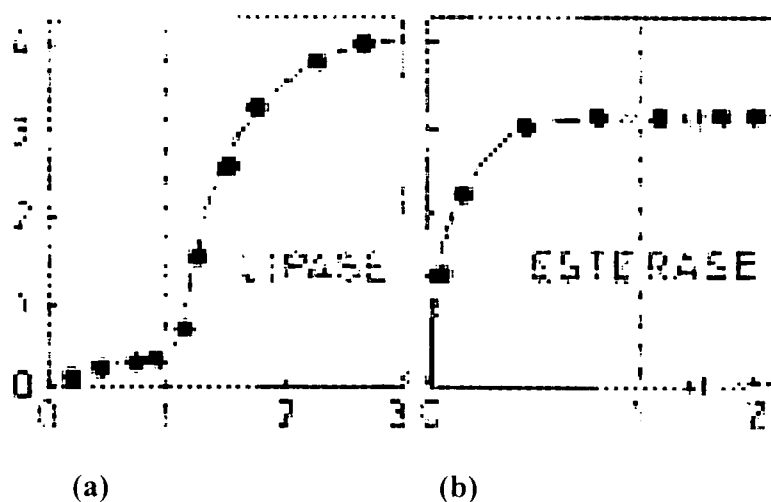
**Figura 1.** Mecanismo catalítico de lipases. Fonte: Jaeger *et al.* (1994).

A utilização de lipases como catalisadores em nível industrial apresenta diversas vantagens relativamente à catálise química e aos biocatalisadores em geral (Watanabe *et al.*, 2001; Sebastião, 1991). Dentre elas, pode-se citar a sua elevada especificidade; a diminuição de riscos para a saúde, quando utilizadas na indústria alimentar; os baixos níveis de ocorrência de reações laterais e as condições reacionais brandas, que permitem um menor consumo energético e evitam a degradação ou decomposição de produtos e reagentes. Entretanto, sua atividade catalítica, como para todas as enzimas, é frequentemente muito sensível às condições experimentais, como variações bruscas de temperatura, de pH e de força iônica. Contudo, um estudo otimizado na obtenção de condições apropriadas, possibilita a catálise de forma eficiente (Krieger *et al.*, 1997b).

## 2.2. O Fenômeno da Ativação Interfacial

As lipases podem ser consideradas como uma classe especial de esterases: enquanto as esterases catalisam a hidrólise de ésteres de cadeia curta, as lipases hidrolisam preferencialmente ésteres de ácidos graxos de cadeia longa e aumentam significativamente sua atividade quando atuam em agregados micelares de substrato, isto é, quando o substrato, na forma monomérica, excede o seu limite de solubilidade (concentração micelar crítica, CMC) (Verger, 1980).

A formação de agregados de triacilgliceróis conduz à existência de interfaces lipídeo/água, onde as lipases são especialmente ativas. Este fenômeno cinético tem sido designado como ativação interfacial e foi proposto por Sarda e Desnuelle (1958), para distinguir lipases de esterases. A atividade esterásica seria função da concentração do substrato, como descrito por Michaelis Menten, com a velocidade máxima sendo obtida antes da saturação por substrato e a formação de agregados ou interfaces lipídeo/água (Figura 2b). Ao contrário, lipases mostrariam sempre a mesma atividade até a obtenção da saturação do substrato e a formação de uma emulsão. Após o limite de solubilidade do substrato ser excedido, haveria aumento da atividade enzimática (Figura 2a). Baseados nestas observações, os autores concluíram que lipases seriam ativadas pela presença de uma interface lipídeo/água e propuseram que a ativação interfacial pode ser usada para diferenciar lipases “verdadeiras” de esterases, já que esterases não mostrariam a propriedade de sofrer ativação interfacial.



**Figura 2.** Ativação interfacial das lipases. Concentração de substrato no ponto 1,0 corresponde ao ponto de saturação do substrato. a) curva de substrato para lipase; b) curva de substrato para esterase. Fonte: Sarda e Desnuelle (1958).

Como exemplo de lipases que apresentam este tipo de ativação interfacial encontram-se as lipases de *Rhizomucor miehei* (Brzozowsky *et al.*, 1991; Brady *et al.*, 1990), lipase pancreática humana (Tilbeurgh *et al.*, 1993) entre outras. Entretanto, o conceito de ativação interfacial nem sempre é adequado para a distinção entre lipases e esterases, visto que embora esta seja uma característica apresentada por diversas lipases, existem muitas exceções (Jaeger e Reetz, 1998; Cygler e Schrag, 1997).

Com o objetivo de esclarecer a causa para o aumento da atividade lipolítica conhecida por ativação interfacial, na última década foram determinadas as estruturas tridimensionais de várias lipases. As primeiras estruturas a serem resolvidas mostraram que o centro ativo das lipases está coberto por uma pequena cadeia de aminoácidos com uma estrutura em alfa hélice. Esta cadeia peptídica é constituída por aminoácidos polares na parte exterior e por aminoácidos apolares na parte interna, que está em contato com o centro ativo. Quando a lipase entra em contato com uma interface lipídeo/água, ocorre um rearranjo conformacional, que consiste no deslocamento da pequena cadeia peptídica de modo a tornar o centro ativo acessível às moléculas de substrato. A ativação interfacial, então, estaria associada à conversão entre as formas “abertas” e “fechadas” das moléculas de lipase (Cygler e Schrag, 1997).

Mesmo que uma lipase apresente ativação interfacial, esta situação pode alterar-se quando a catálise passa a ocorrer em meio orgânico. Neste caso, a lipase não é capaz de adsorver à interface substrato/solvente devido à ausência de uma diferença de hidrofobicidades significativa para gerar uma força motriz capaz de promover a adsorção da lipase à interface (Verger, 1997; Louwrier *et al.*, 1996).

### 2.3. Especificidade

A ação catalítica das enzimas se faz, como a dos catalisadores em geral, através da redução da energia de ativação da reação, sem alteração do seu equilíbrio termodinâmico. Além de reduzirem significativamente a energia de ativação, as enzimas apresentam elevada especificidade. Essa especificidade pode se expressar quanto ao tipo de reação, de substrato ou por fatores que afetam a ligação enzima-substrato (Vaysse *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 1983). A literatura relata que a especificidade das lipases é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação enzima-substrato (Jensen *et al.*, 1983). Há vários tipos de especificidade encontrados: a) quanto ao substrato: diferentes taxas de hidrólise entre

triacilgliceróis, diacilgliceróis ou monoacilgliceróis por uma mesma enzima ou enzimas purificadas de uma mesma fonte; b) posicional ou regioespecificidade: hidrólise preferencial de ésteres primários, secundários, terciários ou hidrólise não específica, liberando ácidos graxos das três posições; c) quanto aos ácidos graxos que compõem o substrato: preferência por ácidos graxos específicos, principalmente quanto ao comprimento da cadeia e número de insaturações; d) estereoespecificidade: discriminação entre enantiômeros, no caso de substratos racêmicos. Pode-se observar também a combinação de todos os tipos citados.

Diversos estudos sobre especificidade de lipases podem ser encontrados na literatura. Lipases de *P. chrysogenum*, por exemplo, apresentam maior especificidade frente a triacilgliceróis em relação a ésteres de *p*-nitrofenila (Ferrer *et al.*, 2000). Lipases de *P. cyclopium* tem maior especificidade por mono e diacilgliceróis de cadeia média (Chahinian *et al.*, 2000). Lipases de *R. oryzae* tem maior especificidade por substrato saturados com cadeias de oito carbonos e pelas posições 1 e 3 do triacilglicerol (Hiol *et al.*, 2000). Lipases de *C. antarctica* são estereosseletivas (*R*-cetoprofeno) em solvente orgânico (Arroyo e Sinisterra, 1995).

## 2.4. Produção de Lipases Fúngicas

### 2.4.1. Tipos de Fermentação

Existem basicamente dois tipos de fermentação para a produção de enzimas: fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES). A FS é a fermentação onde as lipases têm sido produzidas tradicionalmente. Neste tipo de fermentação, a recuperação de enzimas extracelulares e a determinação de biomassa são facilitadas, sendo realizadas por filtração simples para a remoção das células. O sobrenadante da cultura é utilizado para os estudos enzimáticos e o crescimento microbiano é quantificado após secagem da biomassa, por gravimetria (Lima *et al.*, 2003; Krieger, 1995).

A FES consiste num sistema onde o teor de água é restrito, e é também relatada em literatura para a produção de lipases. A produção de lipases em meio sólido não tem sido comumente utilizada, devido ao baixo rendimento observado neste tipo de fermentação, que tem sido relacionado à produção simultânea de enzimas proteolíticas. Há alguns exemplos bem sucedidos na literatura, podendo-se citar a produção de lipases por *Monascus fuliginosus* (Liu *et al.*, 1995), por *R. pusillus* e *R. rhizopodiformis*



utilizando bagaço de cana (Cordova *et al.*, 1998), por *A. niger* utilizando torta de gergelim (Kamini *et al.*, 1998) e farelo de trigo (Mahadik *et al.*, 2002) e por *P. restrictum* utilizando torta de babaçu (Palma *et al.*, 2000; Gombert *et al.*, 1999).

#### 2.4.2. Produção de Lipases

A produção de lipases está geralmente associada ao crescimento do microrganismo (Corzo e Revah, 1999; Freire *et al.*, 1997; Krieger, 1995). Devido a isto, está diretamente relacionada às variações nas condições de cultivo. Cada microrganismo tem necessidades nutricionais específicas. No entanto, em todas as culturas microbianas devem estar presentes fontes carbono e nitrogênio, sais minerais, água e no caso de microrganismos aeróbicos, oxigênio. Além disto, fatores como temperatura, pH e agitação também influenciam na produção de enzimas (Elibol e Ozer, 2001).

A adequação da composição do meio de cultivo é pré-requisito essencial para o crescimento do microrganismo e para a obtenção de altos índices de produtividade de lipases e enzimas em geral, por isso, muitos estudos vêm sendo reportados para definir condições de cultivo ótimas na produção de lipases.

Efeito de sais minerais: de acordo com as exigências nutricionais do microrganismo, os sais minerais requeridos podem ser divididos em duas classes: macro e micronutrientes, utilizados (respectivamente) em concentrações acima de  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>, e igual ou inferior a  $10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>. Dos macronutrientes carbono, hidrogênio, fósforo, potássio, nitrogênio enxofre e magnésio; o carbono é o mais importante para o crescimento do microrganismo, em combinação com o hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Os principais micronutrientes necessários aos microrganismos são magnésio, ferro II, cobre II, cobalto II, zinco II (Wang *et al.*, 1995; Janssen *et al.*, 1994). Estes micronutrientes normalmente são adicionados na forma de sais de sulfato e fosfato (Lin *et al.*, 1995).

Fontes de carbono e indutores: as fontes de carbono mais utilizadas para a produção de lipases são carboidratos (glucose, lactose, maltose, frutose e amido) e lipídeos na forma de óleos vegetais (oliva, milho, soja e palma), em proporções que variam desde 0,5 a 5 % (v/v). Ácidos graxos, especialmente o oleico, e tensoativos como Tween 80 (Lee *et al.*, 1999; Costa e Peralta, 1999; Gerritse *et al.*, 1998; Gao e

Breuil, 1995; Wang *et al.*, 1995; Papaparaskevas *et al.*, 1992; Sugihara *et al.*, 1991), também são citados.

Os óleos vegetais, os ácidos graxos de cadeia longa e os tensoativos, geralmente, além de serem fonte de carbono, induzem a produção de lipases pelos microrganismos. Embora as lipases possam ser constitutivas e produzidas sem a presença de um indutor, maior produção tem sido observada com a adição principalmente de ácido oleico e óleos vegetais, como o de oliva (Lima, 2000; Krieger, 1995).

Efeito da fonte de nitrogênio: a composição dos meios de cultivo para a produção de lipases fúngicas comumente incluem como fontes de nitrogênio compostos orgânicos complexos, como extrato de levedura, peptonas, farinha de soja e milhocina (*corn steep liquor*). De modo geral, melhores resultados são obtidos com fontes orgânicas em relação às fontes inorgânicas como nitrato de amônio. Por exemplo, para a produção de lipases de *P. citrinum*, os melhores resultados foram obtidos com 5 % (m/v) de peptona (Sztajer e Maliszewska, 1989); já para a lipase termoestável de *Pseudomonas sp.* KW1-56 (Izumi *et al.*, 1990), as melhores fontes de nitrogênio foram 2 % (m/v) de peptona com 0,1 % (m/v) de extrato de levedura. Fontes inorgânicas, como o sulfato de amônio e nitrato de potássio, foram utilizadas para a produção de lipases de *P. aurantiogriseum* (Lima *et al.*, 2003). Outras fontes inorgânicas como fosfato de amônio e nitrato de amônio, também são reportados em literatura na produção de lipases de *Rhodotorula glutinis* (Papaparaskevas *et al.*, 1992) e *A. niger* (Pokorny *et al.*, 1994). Fontes como farinha de soja (3 %, m/v) (Ohnishi *et al.*, 1994), cloreto de amônio (1% m/v) (Wang *et al.*, 1995) são utilizadas com menos frequência na produção de lipases.

Efeito da temperatura e do pH: a temperatura de incubação dos cultivos para a produção de lipases depende do microrganismo a ser cultivado, mas para os fungos em geral, a temperatura ótima está entre 25 a 32 °C; para lipases termoestáveis, entretanto, esta temperatura pode variar de 45 a 70 °C (Janssen *et al.*, 1994).

O pH do meio de cultivo durante o desenvolvimento microbiano é dependente dos constituintes do meio de fermentação e do metabolismo do próprio microrganismo. O seu valor pode afetar o crescimento, a formação de produtos, o metabolismo de vários nutrientes e algumas atividades fisiológicas celulares.

Os valores de pH inicial do meio normalmente situam-se entre 4.0 e 7.0, podendo variar durante a fermentação, dependendo dos produtos oriundos de biotransformações, do metabolismo do microrganismo ou da fonte de nitrogênio. No pico máximo de produção da enzima, o pH do meio de cultivo geralmente encontra-se entre 7,0 e 8,0 (Lima, 2000; Krieger, 1995; Jaeger *et al.*, 1994; Sztager *et al.*, 1992), quando fonte de nitrogênio é orgânica. Entretanto quando se utiliza sais de amônio, estão relatados valores de pH muito baixos (2.4) no pico máximo de produção de enzima (Pimentel *et al.*, 1997).

Agitação: os microrganismos aeróbicos são dependentes do mecanismo da respiração para a geração de energia e por isso, requerem oxigênio molecular como receptor de elétrons. Devido à baixa solubilidade do oxigênio em água, é essencial a transferência contínua de oxigênio para o meio líquido de fermentação. Para fungos do gênero *Penicillium*, utiliza-se geralmente rotações em torno de 100 rpm (Lima, 2000; Miranda *et al.*, 1999; Pimentel *et al.*, 1997; Krieger, 1995), mas este valor pode variar dependendo do gênero do fungo.

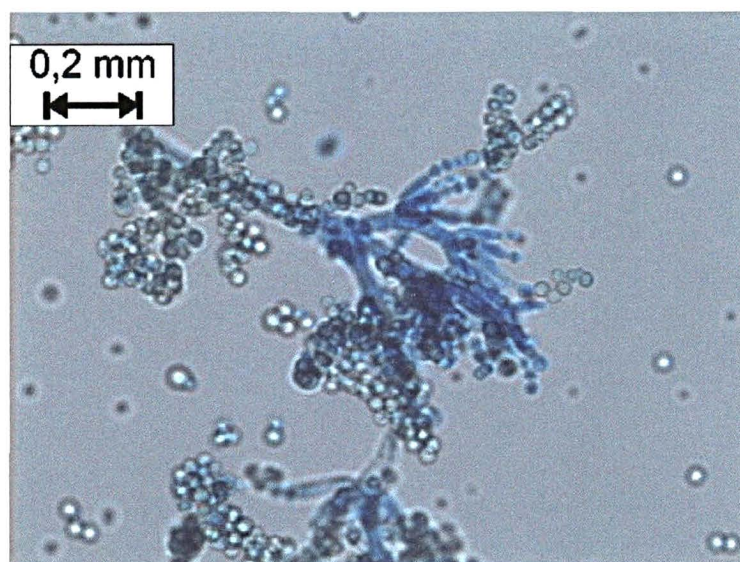
#### **2.4.3. Produção de Lipases por Fungos do Gênero *Penicillium***

*Penicillium* é um gênero de fungos filamentosos conhecido principalmente pela produção de penicilina por cepas de *P. notatum* e *P. chrysogenum* (Jones *et al.*, 1986; Belyanina, 1984; DeTilly *et al.*, 1983). Na produção de enzimas, cita-se a produção de beta-glucosidase por *P. notatum* (Fiedurek, 1998), proteases por *P. camembertii* (Mechakra *et al.*, 1999), glucose-oxidase e catalase por *P. funiculosum* G-15 (Mikailova *et al.*, 2000), quitinase por *P. janthinellum* P9, (Di Giambattista *et al.*, 2001), entre outras.

A produção de lipases por *Penicillium* tem sido reportada largamente na literatura. Destaca-se, por exemplo, cepa de *P. aurantiogriseum* que produziu por fermentação submersa, 10 U.mL<sup>-1</sup> (Lima *et al.*, 2003), a cepa de *P. citrinum* (1,6 U.mL<sup>-1</sup>), (Krieger, 1995) e de *P. restrictum*, com a qual foi obtida produção de lipases, tanto em fermentação submersa, 13 U.mL<sup>-1</sup> do extrato enzimático, quanto em estado sólido (30 U.g<sup>-1</sup> do substrato seco) (Gombert *et al.*, 1999; Freire *et al.*, 1997).

O fungo *P. corylophilum*, também conhecido como *P. citreovirens*, *coeruleoviride* e *corylophiloides*, foi isolado no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise-UFPR, e sua caracterização taxonômica foi realizada no Laboratório de Coleção de

Cultura de Fungos da Fundação Oswaldo Cruz (RJ) (Figura 3). Alguns estudos anteriores com respeito a condições da fermentação, como temperatura e composição dos meios de cultura, foram realizados previamente (Fernandes, 2001a). Resultados como atividade lipolítica de  $5,6 \text{ U.mL}^{-1}$  frente ao óleo de oliva num meio de cultura contendo sais, extrato de levedura e peptona de carne, despertaram o interesse em utilizar este microrganismo como produtor de lipases e posterior utilização desta enzima em biocatálise.



**Figura 3.** Fungo *Penicillium corylophilum* Dierckx IOC 4211, imagem obtida em microscópio petrográfico binocular Olympus e digitalizada pelo programa Image Pro. Plus 2.0, aumento de 400 vezes. O microrganismo foi repicado em meio BDA e mantido a 29 °C por 7 dias. Fonte: Fernandes (2001a).

Na literatura não foram encontradas referências sobre a produção de lipases por *P. corylophilum*. Entretanto, este fungo é principalmente citado como produtor de toxinas, em contaminação de alimentos (Davis *et al.*, 1975), produção de decarestrictinas (inibidor de colesterol) (Grabley *et al.*, 1992), biodegradação do trinitrato de glicerol (Zhang *et al.*, 1997; Sundaram *et al.*, 1997), na produção de aromas (Fujikawa *et al.*, 2002), na bioconversão de esgoto doméstico (Alam *et al.*, 2003; Alam *et al.*, 2002) e produtor de enzimas utilizadas em sacarificação de biomassa e branqueamento de polpas krafts (Medeiros *et al.*, 2003). A ausência de informações na literatura sobre a produção de lipases com esta cepa, motivaram a continuidade dos estudos no presente trabalho.

## 2.5. Aplicações Biotecnológicas das Lipases

Desde o início do século XX, as enzimas lipolíticas são utilizadas no processamento industrial de gorduras e outros lipídeos (Mukherjee, 1990), sendo que suas aplicações industriais estão relacionadas especialmente com o emprego em detergentes. Além disso, são aplicadas nas indústrias alimentícias, papelreira e oleoquímica; na síntese de fármacos e produtos de química fina; na produção de cosméticos, recuperação e manutenção do meio ambiente e na resolução de misturas racêmicas. As razões para o enorme potencial biotecnológico das lipases microbianas incluem o fato de que elas são estáveis em solventes orgânicos, não requerem cofatores, possuem ampla especificidade de substrato e exibem alta enantiosseletividade (Kilinç *et al.*, 2002).

### 2.5.1. Indústria de Detergentes

As lipases são enzimas adicionadas em detergentes para facilitar o rompimento de ligações presentes nos triacilgliceróis e, conseqüentemente solubilizar gorduras aderidas ao tecido. Para utilização em detergentes, algumas características são requeridas: baixa especificidade ao substrato, isto é, habilidade de hidrolisar gorduras de diferentes composições, atividade em condições alcalinas (pH 10-11), assim como em temperaturas de 30 a 60 °C e manutenção da atividade em presença de outros componentes da formulação, como os surfactantes, proteases e agentes oxidantes (Jaeger e Reetz, 1998). Alguns exemplos de enzimas utilizadas em detergentes são a Lipolase (Novozyme, Dinamarca), obtida do fungo *Thermomyces lanuginosa* expressa em *A. oryzae*, Lumafast (Genencor, USA) e Lipomax (Gist-Brocades, Holanda), lipases bacterianas oriundas de *P. mendocina* e *P. alcaligenes* (Jaeger e Reetz, 1998).

### 2.5.2. Indústria Alimentícia

As lipases são intensamente utilizadas na indústria de laticínios na hidrólise da gordura do leite, intensificação do sabor dos queijos e na aceleração do processo de maturação, na fabricação de derivados de queijo e na hidrólise de gorduras e óleos (Kazlauskas e Bornscheuer, 1998; Vulson, 1994).

Uma área da indústria alimentícia em que as lipases desempenham um papel importante é na produção de triacilgliceróis com características específicas. A posição, o grau de insaturação e o tamanho da cadeia influenciam não somente nas propriedades

físico-químicas do triacilglicerol, mas também nos valores nutricionais e sensoriais (Undurraga *et al.*, 2001). Um exemplo é o da manteiga de cacau, que é sólida à temperatura ambiente e funde-se totalmente a 30 °C, devido ao elevado conteúdo de triglicerídeos oriundos do ácido palmítico e esteárico em posição primária e o ácido oleico em posição secundária (Vulson, 1994; Adlercreutz, 1994). A manteiga de cacau tem aplicações em confeitaria e em indústrias farmacêuticas e de cosméticos; mas seu custo é elevado. Alternativamente têm sido sintetizados industrialmente substitutos da manteiga de cacau usando lipases 1,3-específicas, como a *de R. delemar*, e substratos de baixo valor econômico, como a fração média do óleo de palma, rica em 2-oleil-1,3-diapalmitoetilglicerol, e o ácido esteárico ou um éster do ácido esteárico (Mukherjee, 1990).

### **2.5.3. Indústria de Papel e Polpa**

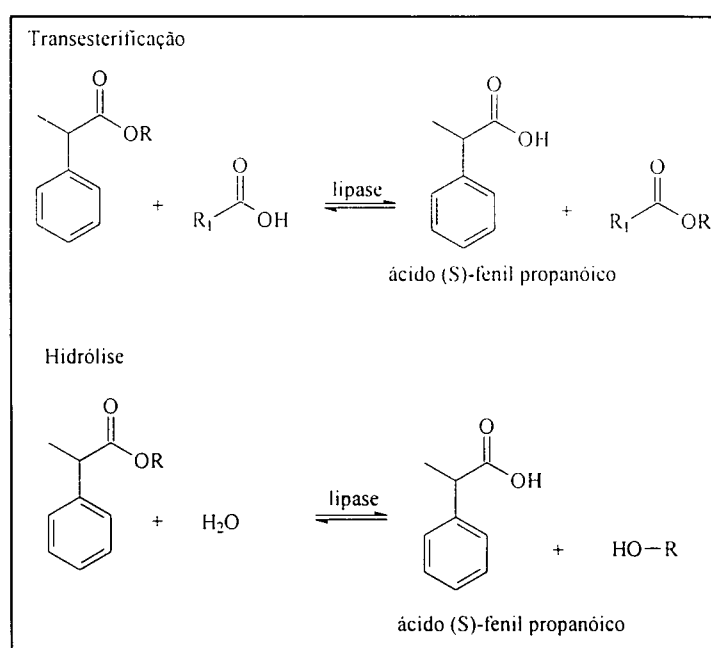
Componentes hidrofóbicos denominados “Pitch”, triglicerídeos e ceras encontrados na madeira causam sérios problemas na manufatura de polpas e papéis. As lipases têm sido utilizadas para remover estes componentes da polpa sendo que lipases de *C. rugosa*, empregadas em uma indústria japonesa, chegam a hidrolisar 90 % dos triglicerídeos encontrados na madeira (Jaeger e Reetz, 1998).

### **2.5.4. Indústria Oleoquímica**

O uso de lipases na indústria oleoquímica, ou seja, em processos que envolvem reações de alcólise, acidólise, hidrólise e glicerólise, economiza energia e minimiza degradações térmicas de produtos e reagentes (Vulson, 1994). As reações de hidrólise na indústria geralmente são realizadas quimicamente, em condições drásticas, através de tratamento com vapor a altas temperaturas (240 a 260 °C) e altas pressões. Mediante estas condições, os ácidos graxos instaurados se decompõem e se polimerizam, formando muitas vezes produtos indesejados. Quando se realiza a hidrólise catalisada por lipases, o processo fica isento de tais problemas, mas, devido ao elevado custo destas enzimas, a hidrólise catalisada por lipases ainda é menos econômica do que a convencional. O processo torna-se economicamente viável para exemplos específicos, como produtos de química fina, pois possuem um alto valor agregado (Lima e Angnes, 1999; Patel *et al.* 1996).

### 2.5.5. Indústria Farmacêutica

A utilização de lipases na indústria farmacêutica deve-se principalmente à enantiosseletividade exibida por muitas destas enzimas. A catálise enantiosseletiva permite a obtenção de produtos opticamente puros, o que é extremamente vantajoso, já que em muitos casos normalmente apenas um dos enantiômeros apresenta atividade terapêutica. Como exemplo, pode-se citar o ácido 2-fenil-propanóico, utilizado na síntese de drogas anti-inflamatórias não esteróides (Ibuprofeno e Naxopreno) e que pode ser obtido através da reação de transesterificação ou de hidrólise do éster correspondente catalisadas por lipases (Figura 4) (Pandey *et al.*, 1999).



**Figura 4.** Representação da síntese enantiosseletiva do ácido 2-fenilpropanóico (intermediário do ibuprofeno). Fonte: Pandey *et al.* (1999).

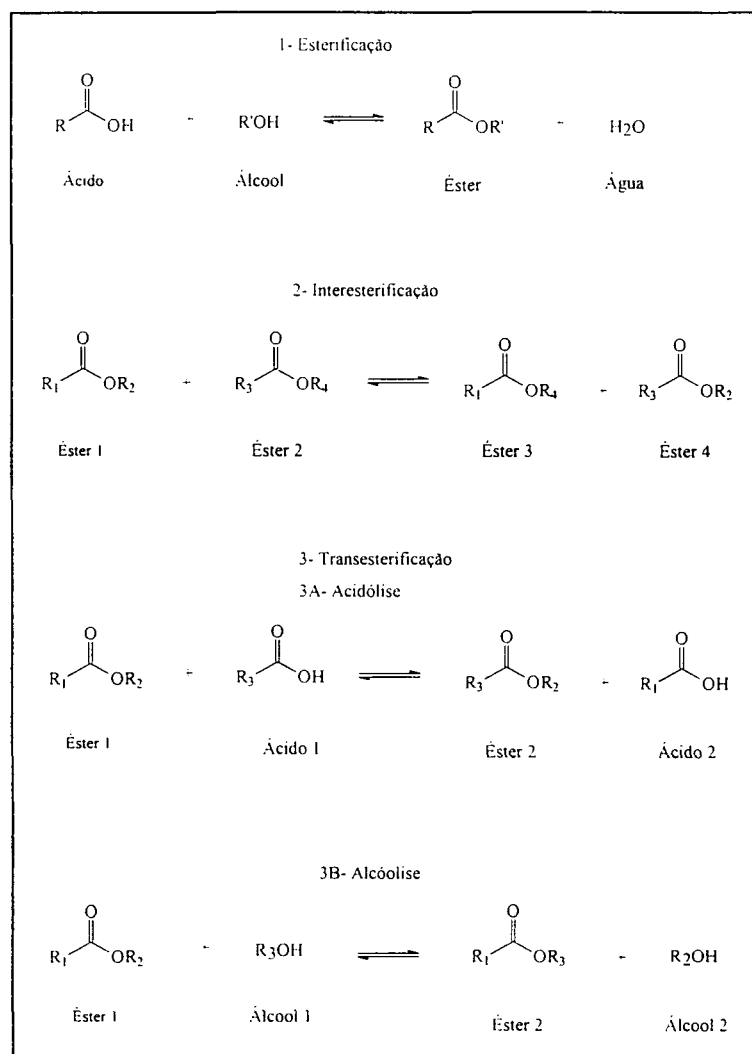
Outro exemplo é a resolução racêmica de álcoois, realizada na Bend Research Inc. (USA) com a lipase de *C. cylindracea* (Vulson, 1994), com vistas à obtenção de prostaglandinas e compostos esteróides.

### 2.5.6. Síntese Orgânica

As lipases utilizadas em síntese orgânica são na maioria de origem microbiana e são empregadas em reações que requerem transformações quimio-, regio-, ou enantiosseletiva (Kazlauskas e Bornscheuer, 1998).

A utilização de lipases enantiosseletivas, entretanto, tem sido limitada por alguns fatores como baixa enantiosseletividade, instabilidade enzimática, à temperatura ou a solventes orgânicos e dificuldade de recuperação da enzima (Jaeger e Reetz, 1998). A minimização destas limitações vem sendo investigada de diversas maneiras. A utilização de organismos extremófilos, através da clonagem de genes de enzimas termofílicas e sua introdução em organismos mesófilos, tem originado enzimas mais estáveis à temperatura. A engenharia de proteínas, incluindo mutagênese randômica e evolução dirigida, a imobilização e complexação de lipases e enzimas em geral, são técnicas para obtenção de lipases com características especiais e com maior estabilidade (Sellek e Chaudhuri, 1999).

Os ésteres podem ser obtidos através de reações de esterificação, interesterificação ou transesterificação (Figura 5).



**Figura 5.** Esquema das reações de síntese: esterificação, interesterificação e transesterificação catalisadas por lipases. Fonte: Villeneuve *et al.* (2000).



### 2.5.7. Biorremediação

As lipases podem ser utilizadas para remoção de óleos presentes nas águas residuais de fábricas, restaurantes ou residências, ou provenientes de indústrias de refinação de óleos e que poluem solos e água (Suzuki *et al.*, 2001; Margesin *et al.*, 2000; Pandey *et al.*, 1999; Reetz e Jaeger, 1998). Além disso, também podem ser utilizadas na remoção de depósitos de gorduras que se formam em sistemas de tubulação de água quente, bebidas e alimentos líquidos (Pandey *et al.*, 1999).

A aplicação de microrganismos produtores de lipases na degradação de hidrocarbonetos derivados do petróleo é sugerida como uma alternativa de biorremediação (Marín *et al.*, 1995)

## 2.6. Biocatálise em Meio Orgânico

O termo biocatálise abrange os processos em que um catalisador biológico é utilizado para converter um substrato em um produto que tenha alguma aplicação, com um número limitado de etapas enzimáticas. O termo biotransformação, anterior à biocatálise, está associado ao metabolismo do microrganismo e consiste em transformar compostos considerados tóxicos para o microrganismo em substâncias atóxicas (Wackett e Hershberger, 2001). Na biotransformação, a água é o solvente preponderante e consequentemente, este solvente foi e ainda é utilizado em inúmeros estudos de cinética enzimática, devido principalmente, à idéia preconcebida de que este é o único ambiente para a manutenção da conformação estrutural da enzima cataliticamente ativa. Entretanto, observou-se que o uso exclusivo de água como solvente em meios reacionais, restringia a gama de aplicações da biocatálise, bem como, limitava a produtividade de diversos processos, nomeadamente os que envolviam substratos hidrofóbicos. Por outro lado, a constatação de que muitas enzimas, tais como lipases, esterases, desidrogenases e aquelas responsáveis pelo metabolismo xenobiótico (transformam compostos tóxicos em menos tóxicos ou atóxicos), operam *in vivo* em ambientes ricos em lipídeos, levou à conclusão de que estes meios, predominantemente não-aquosos, também podem ser adequados à expressão de atividade enzimática. A convergência destes dois aspectos conduziu à utilização como meio reacional, de solventes orgânicos, fluidos supercríticos e iônicos, fases gasosas ou fases sólidas, aos quais se convencionou atribuir a designação de meios não-convencionais.

Entretanto, é importante salientar que mesmo quando se utiliza o termo “solventes orgânicos”, no caso de reações catalisadas por enzimas, um teor mínimo de água é requerido para a manutenção da sua estrutura cataliticamente ativa (Klibanov, 2001). Assim, neste trabalho convencionou-se utilizar os termos “aquo-restritos” e “em solventes orgânicos” ou “não-convencionais” para designar reações catalisadas por enzimas onde a água não é o solvente.

### ***2.6.1. Fatores que Influenciam a Biocatálise em Meio Orgânico***

#### ***2.6.1.1. Água***

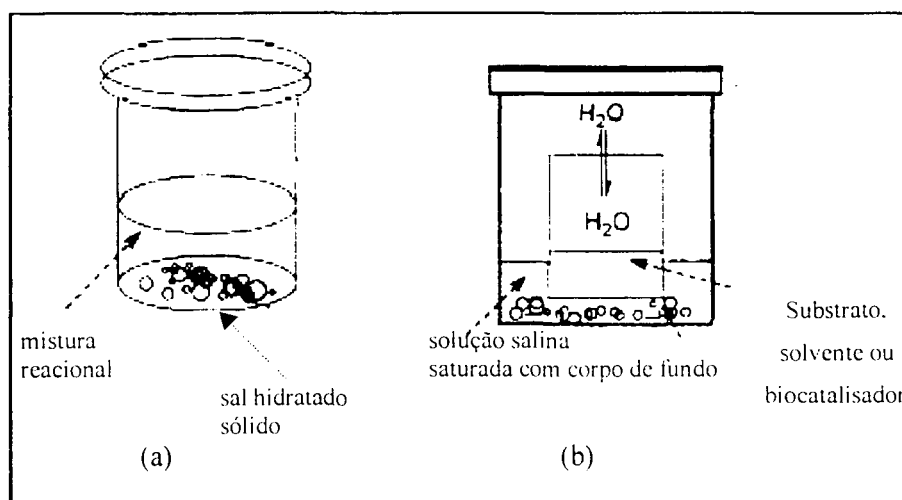
O conteúdo de água é um parâmetro crucial na biocatálise em meio orgânico, especialmente quando se trata de reações de síntese ou hidrólise de ésteres, porque o teor de água influencia no equilíbrio de reação, bem como na manutenção da estrutura tridimensional da enzima (Gayot e Coulon, 2003).

Normalmente, somente uma quantidade mínima de água é necessária para manter a enzima ativa; esta quantidade mínima denomina-se camada de água essencial, pois protege a enzima de desnaturação pelos solventes orgânicos. A camada essencial de água pode ser quantificada através da atividade termodinâmica da água ( $a_w$ ) (Halling, 1989), que é definida como a pressão parcial da água ( $p_w$ ) sobre a pressão parcial da água pura ( $p_w^\circ$ ) (equação 1). A atividade de água representa a umidade relativa do sistema considerado, situando-se os valores de  $a_w$  entre 0 a 1. Em  $a_w$  de 1 já existe uma fase aquosa distinta.

$$a_w = p_w / p_w^\circ \quad (1)$$

Em um sistema de solventes orgânicos, este parâmetro pode ser controlado adicionando misturas de sais com um determinado teor de água ao solvente e aos substratos ou incubando separadamente, a enzima, o solvente e os substratos em cubas hermeticamente fechadas contendo soluções salinas saturadas (Figura 6 a,b) (Sellek e Chaudhuri, 1999; Kvittingen, 1994).

Para uma mesma reação, o  $a_w$  ótimo depende consideravelmente da enzima empregada, devido aos diferentes grupos funcionais e arranjos tridimensionais que cada enzima possui (Salis *et al.*, 2003; Mattias *et al.*, 2002).



**Figura 6.** Sistemas de controle de  $a_w$ : a) adição direta do sal hidratado no meio reacional b) pré-equilíbrio (individualmente) do substrato, solvente e do biocatalisador. Fonte: Kvittingen (1994).

#### 2.6.1.2. Solvente

Os efeitos do solvente sobre a biocatálise em sistemas aquo-restritos podem ser diretos ou indiretos. Os indiretos estão relacionados à partição de reagentes e de produtos, à alteração do equilíbrio químico e à transferência de massa em sistemas de duas ou mais fases. Os efeitos diretos são responsáveis pela redução da atividade e pela inativação da enzima através de dois mecanismos: primeiramente, pela interação solvente-enzima, que altera a conformação nativa da proteína, pela quebra das ligações de hidrogênio. A segunda possibilidade seria pela interação direta com a água essencial em torno da molécula enzimática. Solventes polares são capazes de absorver água e retirar a camada de hidratação da enzima, provocando a perda das propriedades catalíticas por inativação ou desnaturação (Simon *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 1987).

A literatura (Hazarika *et al.*, 2002; Sellek e Chaudhuri, 1999) descreve inúmeras maneiras de quantificar a hidrofobicidade de um solvente, como por exemplo,  $\delta$ : parâmetro de solubilidade de Hildebrand; ET: solvatocromismo de corante;  $\epsilon$ : constante dielétrica;  $\mu$ : momento dipolar e  $\log P$ : logaritmo do coeficiente de partição, sendo este último um dos mais utilizados. A medida da hidrofobicidade do solvente através do  $\log P$  considera o logaritmo do coeficiente de partição do solvente num sistema padrão n-octanol/água, conhecido como parâmetro de Hansch. O valor de  $\log P$  de um dado solvente pode ser determinado experimentalmente ou calculado através do método das constantes hidrofóbicas fragmentadas de Rekker (Mannhold e Rekker, 2000). Trabalhos realizados em diferentes sistemas biocatalíticos, envolvendo o uso de solventes com

diferentes hidrofobicidades, confirmaram a existência de uma tendência generalizada para a relação entre a atividade catalítica e a hidrofobicidade do solvente, traduzida por uma curva sigmoideal. Em média, solventes com log P inferior a 2-3 são considerados desnaturantes, enquanto aqueles com log P superiores a 4-5 são considerados biocompatíveis, muito embora os pontos de inflexão sejam dependentes do biocatalisador. O deslocamento do ponto de inflexão também pode ser motivado pelo grau de agitação do meio (Fernandes *et al.*, 2001).

#### 2.6.1.3. pH e Alteração da Especificidade Enzimática

Todas as reações enzimáticas em meio aquoso são fortemente dependentes do pH, visto que o estado de ionização da enzima é essencial para a catálise. No meio orgânico, segundo Klibanov (2001), normalmente obtêm-se atividades máximas em meio orgânico no pH correspondente ao pH ótimo em solução aquosa. Segundo o autor, a enzima adquire uma memória de pH; isto implica em que os grupos ionizáveis das moléculas de enzima, tendo uma certa ionização a um dado valor de pH em solução aquosa, mantêm essa ionização quando estão sob a forma de partículas sólidas ou quando são liofilizadas em solução com pH ótimo para a atividade. A perda da memória de pH na hidratação de uma amostra liofilizada, por exemplo, pode ser atribuída a redistribuição de cargas na superfície da proteína.

Com relação à especificidade da enzima, tem sido registrado que a liofilização em soluções aquosas contendo ou não certos componentes denominados “ligantes”, tem efeitos significativos sobre a atividade catalítica de algumas enzimas em fase orgânica. A enzima pode assumir uma nova conformação, mais ativa ou mais específica quando é liofilizada em solução aquosa ou em presença de algum ligante. Por exemplo, a liofilização da  $\alpha$ -quimotripsina em soluções aquosas contendo N-acetil-l-fenilalanina teve um efeito significativo, aumentando 35 vezes a atividade catalítica desta enzima em meio orgânico. Zaks e Klibanov (1984) comprovaram que a lipase pancreática suína, em meio aquoso, reage indiferentemente com substratos pequenos ou grandes, enquanto que a enzima desidratada, em meio orgânico, não reage com moléculas grandes, provavelmente devido à rigidez do seu centro ativo, que não pode mais acomodar estes substratos.

### 2.6.2. Vantagens e Desvantagens da Biocatálise em Meio Aquo-Restrito

Inúmeras pesquisas têm demonstrado as vantagens da biocatálise em meios aquo-restritos, oferecendo uma oportunidade ímpar para o desenvolvimento de novas tecnologias. No caso de solventes orgânicos, algumas vantagens ao se utilizar o sistema são: **a)** a catálise pode ser alcançada de forma eficiente com substratos pouco polares e pouco solúveis em água, o que é especialmente recomendado para lipases, que atuam sobre substratos insolúveis em água, em interfaces; **b)** para as reações de esterificação, interesterificação ou transesterificação, catalisadas por enzimas, além da vantagem da maior solubilidade dos substratos e produtos, a biocatálise em ambiente aquo-restrito permite um baixo teor de água no sistema, necessário para deslocar o equilíbrio no sentido da síntese em esterificação; **c)** o solvente pode induzir modificações na estrutura enzimática, aumentando a sua eficiência catalítica ou a sua especificidade frente ao substrato; **d)** as reações indesejáveis, bem como a inibição da enzima pelo substrato ou pelo produto pode ser reduzida, uma vez que estes compostos estão normalmente dissolvidos no solvente orgânico, e portanto, fora do contato com a enzima; **e)** a estabilidade térmica das enzimas pode ser aumentada, pois estas assumem uma conformação mais rígida; **f)** a contaminação microbiana diminui; **g)** muitos solventes orgânicos possuem ponto de ebulição menor que da água favorecendo a remoção dos solventes; **h)** finalmente, a imobilização é freqüentemente desnecessária, porque enzimas são insolúveis nestes meios. Quando, porém, a imobilização é desejada, a simples adsorção da enzima em superfícies não-porosas é suficiente, facilitando a recuperação e a reutilização do biocatalisador (Gotor, 2002; Hazarika *et al.*, 2002; Secundo e Correa, 2002; Roy e Chawla, 2001; Linko *et al.*, 1995).

As desvantagens que a biocatálise em solventes orgânicos pode apresentar são: **a)** o solvente pode reduzir a atividade enzimática, devido à toxicidade do solvente; **b)** nos sistemas bifásicos a inativação enzimática interfacial pode acontecer; **c)** aumento das limitações difusionais à transferência de massa de substratos ou produtos, uma vez que se introduz além da fase aquosa uma ou mais fases, líquida-líquida, no caso da fase orgânica apolar ou líquida-líquida-sólida, quando além do solvente apolar, estiver presente o biocatalisador imobilizado. Adicionalmente a estes fatores deve-se considerar os custos adicionais para a segurança do processo e o tratamento dos efluentes, incluindo a possível reutilização do solvente orgânico.

### 2.6.3. Sistemas Reacionais Aquo-Restritos

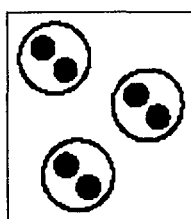
Nos últimos anos, têm-se realizado vários estudos sobre reações enzimáticas em meio orgânico. Em sentido restrito, podem ser considerados como ambientes não-aquosos os solventes orgânicos, os fluidos supercríticos, os gases, os substratos líquidos ou misturas eutéticas de substratos livres de solvente (Lima e Angnes, 1999). Considerando os sistemas reacionais utilizados na biocatálise, os meios aquo-restritos podem ser classificados em sistemas macro-heterogêneos, em que se observa separação de fases, e micro-heterogêneos onde a separação de fases não pode ser observada macroscopicamente (Sellek e Chaudhuri, 1999; Jonathan *et al.*, 1989; Khmelnitsky *et al.*, 1988).

#### 2.6.3.1. Sistemas Macro-Heterogêneos

##### 2.6.3.1.1. Sistemas Bifásicos

Nestes sistemas, a enzima ou solvente utilizado não são miscíveis com água. Os principais tipos de sistemas macro-heterogêneos são:

**a) líquido-líquido:** este sistema é constituído de uma fase aquosa, onde a enzima está solubilizada e a fase orgânica é composta de um solvente não-miscível na água, no qual são dissolvidos os substratos (Figura 7). O mecanismo de atuação da enzima é similar àquele em meio aquoso, uma vez que uma quantidade mínima de água é mantida no sistema para assegurar a manutenção da sua estrutura catalítica. A reação enzimática ocorre na fase aquosa, na qual os substratos difundem-se a partir da fase orgânica, sendo que a fase aquosa representa de 1 a 5 % do volume reacional total.

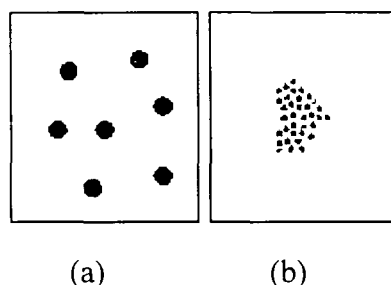


**Figura 7.** Representação esquemática de um sistema reacional macro-heterogêneo bifásico (líquido-líquido). A fase líquida orgânica ( ) é constituída pela solução de substrato num solvente orgânico apolar e a fase líquida aquosa (□) contém a enzima (●). Fonte: Gonçalves (1999).

As principais vantagens deste sistema são a sua fácil preparação e a facilidade de reutilização da enzima e de separação do produto. No entanto, estes sistemas apresentam desvantagens como área interfacial pequena, o que diminui a velocidade de transferência de massa. Como as lipases são enzimas que atuam em interfaces e cuja velocidade de catálise depende da área interfacial, é necessário ter-se em consideração a alteração da área interfacial no decorrer da reação (Verger, 1997).

Um dos fatores fundamentais num sistema deste tipo é a escolha do solvente orgânico. Características como capacidade de solubilização bastante elevada, tanto para os substratos como para os produtos, baixa solubilidade na fase aquosa contendo a enzima e baixa toxicidade para a enzima, são recomendadas. Normalmente, usam-se solventes orgânicos hidrofóbicos com log P superior a 4. Em alguns casos o solvente é o próprio substrato (Ahmad *et al.*, 1998; Jesus *et al.*, 1997; Manjon *et al.*, 1991).

**b) sólido-líquido:** nestes sistemas, a enzima está na forma sólida liofilizada ou imobilizada (item 2.6.3.3.), em suspensão com a fase orgânica que contém os substratos (Figura 8). Mesmo quando a enzima está na forma liofilizada, o sistema pode ser considerado como bifásico, pois a maioria das lipases é insolúvel em solventes orgânicos. Neste caso, quando o teor de água presente no sistema é muito baixo, expresso pela atividade de água ( $a_w$ ) (Chowdary e Prapulla., 2002), não constitui uma fase distinta, pois estará solubilizada no solvente ou incorporada ao biocatalisador. Esta quantidade de água forma uma camada de hidratação ao redor da enzima, protegendo-a da desnaturação pelo solvente.



**Figura 8.** Representação esquemática de um sistema reacional macro-heterogêneo bifásico (sólido-líquido). (a) biocatalisador imobilizado (•) ressuspenso em meio orgânico; (b) biocatalisador liofilizado (•••) e na forma de cristais, ressuspenso em meio orgânico. A fase líquida orgânica ( ) é constituída pela solução de substrato num solvente orgânico apolar. Fonte: Gonçalves (1999).

A enzima, na forma sólida e completamente sem a camada de hidratação, pode ter a capacidade de se manter ativa no meio orgânico, possivelmente devido à formação, na superfície da partícula sólida de enzima, de uma camada de proteína desnaturada, que protege as camadas interiores do contato com o solvente orgânico.

Quando o sistema for composto por água e solvente polar, é essencial escolher um solvente que mantenha a conformação catalítica ativa da enzima. Relativamente a utilização da enzima imobilizada, é conveniente usar um método de imobilização por ligação covalente a um suporte sólido ou por confinamento num suporte poroso, de forma a minimizar a possibilidade de perda da enzima do suporte de imobilização para a fase líquida, já que neste sistema, devido aos grupos hidrofílicos da enzima, pode ocorrer a dessorção desta para o meio reacional (Gonçalves, 1999).

Este tipo de sistema tem sido utilizado essencialmente em reações de esterificação e transesterificação, conduzindo normalmente a conversões bastante elevadas, mas com atividades catalíticas baixas devido a problemas difusionais e de transferência de massa entre a enzima com os substratos e produtos (Oliveira *et al.*, 2001; Russel *et al.*, 1998; Borzeix *et al.*, 1992).

#### 2.6.3.1.2. Sistemas Trifásicos

**Sólido-líquido-líquido:** este sistema é muito semelhante ao anterior. Ele contém uma fase aquosa, um solvente orgânico apolar e a enzima imobilizada ou liofilizada. Neste sistema é possível reduzir a fase aquosa para valores inferiores ao sistema bifásico líquido-líquido, permitindo alterar o equilíbrio termodinâmico das reações, de modo a favorecer a síntese em relação à hidrólise, quando se tratar de uma esterificação, por exemplo (Sellek e Chaudhuri, 1999; Jonathan *et al.*, 1989; Khmelnsky *et al.*, 1988).

#### 2.6.3.2. Sistemas Micro-Heterogêneos

**a) Solvente orgânico solúvel na fase aquosa:** um solvente miscível em água é adicionado à solução reacional na qual a enzima está dissolvida. Apesar de não apresentar restrições à transferência de massa, este sistema possui alguns inconvenientes, como a dificuldade de separação e purificação do produto; além disso, a enzima não pode ser reutilizada, e as possibilidades de catálise são limitadas devido à alta concentração do solvente (superior a 50 %), o que normalmente causa inativação



parcial ou total da enzima por competição pela água existente no sistema e por interação iônica com a estrutura protéica (Sellek e Chaudhuri, 1999; Jonathan *et al.*, 1989; Khmelnitsky *et al.*, 1988).

**b) Sistema de micelas reversas:** é formado por estruturas esféricas que encapsulam o biocatalisador, sendo composto por um solvente apolar e um surfactante. Este sistema será melhor descrito no item 2.6.3.4.

**c) enzimas modificadas:** um outro tipo de sistema micro-heterogêneo é o de enzimas modificadas, onde a fixação de moléculas hidrofílicas, como o PEG (polietilenoglicol), sobre as moléculas da proteína permite a solubilização do biocatalisador nos solventes orgânicos (Paiva *et al.*, 2000; Ivanov e Shneider, 1997; Balcão e Paiva, 1996). A enzima modificada torna-se solúvel em solventes orgânicos, permitindo a sua utilização direta nestes meios. Este sistema apresenta importantes vantagens em relação ao anterior. A enzima quimicamente modificada apresenta estabilidade superior, é facilmente recuperada do meio reacional e pode ser reutilizada. O solvente orgânico usado é normalmente um solvente de caráter hidrofóbico, com log P superior a 2. A água encontra-se presente somente em nível molecular, associada às cadeias da enzima, permitindo que esta permaneça hidratada e cataliticamente ativa. Devido à ausência de limitações difusionais e ao aumento da estabilidade enzimática em consequência da modificação química, as atividades catalíticas são normalmente bastante elevadas (Patel *et al.*, 1996).

#### 2.6.3.3. Enzimas Imobilizadas

A aplicação eficaz de enzimas tem sido restrita devido à uma série de limitações, particularmente àquelas referentes à sua estabilidade operacional e à possibilidade de reutilização do biocatalisador. Estas características são essenciais para uso por longos períodos ou para procedimentos automatizados, como para biossensores, por exemplo. Para eliminar esses efeitos desfavoráveis, algumas estratégias têm sido investigadas. A mais antiga é a via sintética, que utiliza técnicas da química orgânica, buscando a síntese de catalisadores com atividades similares à de enzimas. Outra abordagem tem sido a utilização de procedimentos de imobilização das enzimas.

Enzimas imobilizadas são aquelas que estão confinadas em um espaço, imaginariamente ou materialmente, ou seja, barreiras que permitem que a enzima entre em contato com o substrato do meio de reação, catalisando as reações (Paiva *et al.*, 2000; Bastida *et al.*, 1998). As pesquisas sobre este assunto intensificaram-se a partir dos anos 60, no sentido de estabelecer métodos eficientes de imobilização, quer por meios físicos, quer químicos, ou em suportes inertes insolúveis (Vitolo, 2001).

As principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas são a possibilidade de reutilização das enzimas, a facilidade de recuperação dos produtos, a maior facilidade de controle e de operação de processos e reatores, e a minimização da produção de efluentes. Além disso, muitas vezes com o processo de imobilização, as propriedades enzimáticas são alteradas, produzindo biocatalisadores com atividade, especificidade e estabilidade aumentadas, dependendo do tipo de imobilização e da enzima (Persson *et al.*, 2002b; Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998). Os métodos de imobilização estão disseminados tanto em aplicações industriais, como em sistemas de análise. Exemplos de aplicações analíticas envolvendo enzimas imobilizadas são os biossensores, os reatores para análises cromatográficas ou em sistemas de análise por injeção em fluxo, podendo ainda destacar-se as aplicações envolvendo *kits* para titulações e para imunoensaios. Entretanto, foram também relatadas algumas desvantagens com relação aos procedimentos de imobilização, como perda de atividade enzimática, limitações difusionais, além de muitas vezes, dependendo do tipo de imobilização, os métodos serem trabalhosos e bastante demorados e acarretarem custos adicionais na produção de um biocatalisador (Villeneuve *et al.*, 2000; Lima e Angnes, 1999).

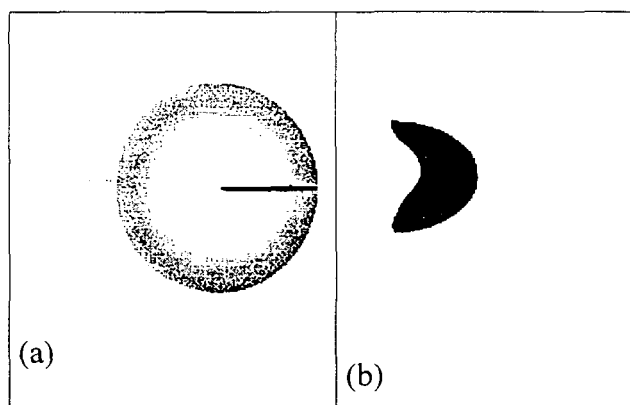
Os processos de imobilização podem ser classificados em quatro tipos principais (Vitolo, 2001):

- Separação por membranas: neste método a enzima encontra-se fisicamente separada do meio de reação, através de uma película (membrana) semipermeável, e que por sua vez pode ser subdividida em:

**Encapsulamento**: a enzima é imobilizada no interior de esferas, cujo envoltório é constituído por um polímero geleiforme e semi-permeável.

**Membranas fibrosas semi-permeáveis**: este método consiste no confinamento da enzima numa dada região da solução, através de uma membrana semi-permeável. As limitações difusionais são intensas.

- Microencapsulamento: consiste na preparação de um sistema emulsionado, onde a enzima está confinada no interior de micelas. Como este sistema foi utilizado no trabalho, será melhor reportado no item 2.6.3.4.
- Entrelaçamento em polímeros: este método consiste no aprisionamento das moléculas enzimáticas entre as malhas de um polímero geleiforme. A eficiência do entrelaçamento, a permeabilidade do gel e sua resistência mecânica dependerão da composição dos reagentes e da natureza do monômero utilizado.
- Formação de ligação covalente: a enzima é ligada ao suporte inerte mediante ligações químicas covalentes, que são normalmente estabelecidas entre os aminogrupos primários e o anel fenólico dos aminoácidos constituintes da enzima, com os grupos reativos do suporte (Figura 9a).



**Figura 9.** Representação da imobilização através de (a) ligação covalente. A enzima representada pela esfera está na forma “fechada”; (b) através de adsorção. A enzima representada pela esfera está na forma “aberta”. Fonte: Palomo *et al.* (2002).

- Adsorção: este método consiste na adsorção da enzima em um suporte inerte, através de ligações eletrostáticas e hidrofóbicas, tais como interações iônicas, forças de “van de Waals”, ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo e interações hidrofóbicas (Figura 9b).

Normalmente, a quantidade máxima de proteína adsorvida corresponde à uma mono-camada que recobre a superfície do suporte. A adsorção depende do pH da solução enzimática, obtendo-se valores máximos de adsorção no ponto isoelétrico da proteína. Esta situação pode ser explicada pelo fato de que, no valor de pH correspondente ao ponto isoelétrico da proteína, a repulsão eletrostática entre as

moléculas de proteína é minimizada. A adsorção de enzimas em superfícies pode induzir a algumas alterações conformacionais na molécula da enzima, devido a interações entre a enzima e o suporte. Suportes hidrofóbicos conseguem adsorver maiores quantidades de enzima e a densidade da camada de adsorção também pode ser maior, relativamente aos suportes hidrofílicos. Estes resultados indicam que as interações entre a enzima e o suporte são bastante fortes nos suportes hidrofóbicos, o que pode causar, em alguns casos, maiores alterações conformacionais na enzima. Quando se utiliza suportes menos hidrofóbicos, a retenção da atividade aumenta, mas a quantidade de proteína adsorvida diminui e as interações entre a enzima e o suporte serão menores. Este tipo de imobilização pode também ser considerado como uma etapa de purificação parcial da enzima (Gonçalves, 1999), uma vez que a proteína pode ser seletivamente adsorvida sobre o suporte.

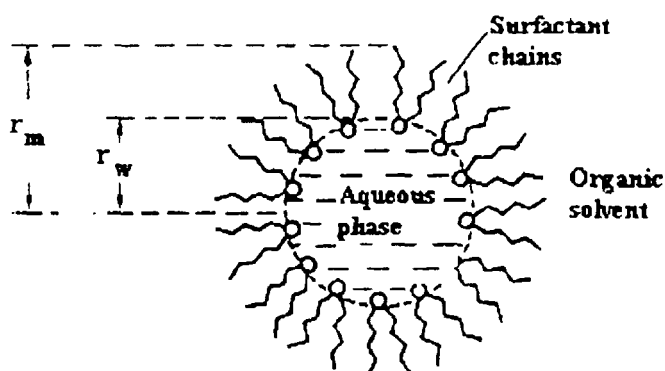
Dentre todos os métodos, a adsorção ainda é o mais utilizado, devido à facilidade e simplicidade na metodologia, e por ser economicamente mais barato e menos agressivo em relação à atividade enzimática. No caso de lipases, verificou-se que o processo de imobilização por adsorção e por interação hidrofóbica pode propiciar uma ativação da enzima e um aumento de sua estabilidade frente à temperatura (Knezevic *et al.*, 2002; Paiva *et al.*, 2000).

#### 2.6.3.4. Enzimas Encapsuladas em Micelas Reversas

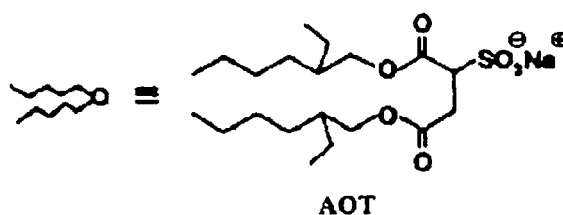
Outra técnica utilizada para superar os problemas da baixa solubilidade dos substratos, no caso de lipases, é o uso de surfactantes em micelas reversas. Os sistemas de micelas reversas (Figura 10) são agregados organizados de íons de surfactantes dispersos em meio orgânico apolar com 1 a 10 nm de diâmetro e constituídos por gotículas de água, sendo a quantidade de água controlada pelo parâmetro  $W_0 = [\text{H}_2\text{O}] / [\text{surfactante}]$  (Chuanyi *et al.*, 2002; Carvalho e Cabral, 2000; Sebastião, 1991).

Este sistema diferencia-se das micelas normais devido à sua orientação inversa em relação à formação da estrutura micelar em água. O surfactante por sua vez, é composto por moléculas que possuem uma parte hidrofóbica (apolar) e outra hidrofílica (polar), esta última podendo ser aniônica, catiônica ou não iônica. Os principais surfactantes utilizados em biocatálise são os catiônicos e aniônicos. Nos sistemas que utilizam surfactantes catiônicos, como por exemplo, o CTBA (brometo de cetiltrimetilamônio) as micelas são relativamente pequenas para conter uma proteína enzimática, sendo

necessária a adição de um co-surfactante, normalmente um álcool alifático. O co-surfactante divide-se entre a interface e a fase orgânica, possibilitando a solubilização de uma maior quantidade de água e aumentando o tamanho da micela. Os surfactantes aniônicos, como por exemplo, o AOT (Figura 11), um dos mais estudados e eficazes para a catálise enzimática, não necessitam de co-surfactantes, pois formam agregados micelares capazes de solubilizar grandes volumes de água (Chuanyi *et al.*, 2002; Krieger *et al.*, 1997 a,b).



**Figura 10.** Representação esquemática de uma micela reversa, na qual a enzima ocupa a parte central da micela. Fonte: Carvalho e Cabral (2000).



**Figura 11.** Surfactante dioctilsulfosuccinato de sódio (AOT). Fonte: Carvalho e Cabral (2000).

Um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a atividade do surfactante é sua concentração micelar crítica (CMC), que é a concentração mínima de surfactante necessária para alcançar a menor tensão superficial. Abaixo da CMC, o tensoativo está na forma de monômeros; quando a concentração está abaixo, mas próxima da CMC, existe um equilíbrio dinâmico entre monômeros e micelas. Em concentrações acima da CMC, as micelas possuem um diâmetro entre 3-6 nm o que representa a existência de 30-200 monômeros de tensoativo por micela. A CMC depende da estrutura do surfactante (tamanho da cadeia do hidrocarboneto) e das condições experimentais (força iônica, contra-íons, temperatura). As micelas são termodinamicamente estáveis, mas são

destruídas pela diluição com água, quando a concentração do surfactante ficar abaixo da CMC (Maniasso, 2001; Carvalho e Cabral, 2000). A faixa de concentração 100 a 200 mmol.L<sup>-1</sup> e as condições utilizadas nos trabalhos com as lipases e outras enzimas (Kamyshny *et al.*, 2002; Garcia-Moreno *et al.*, 2001; Carvalho e Cabral, 2000; Krieger *et al.*, 1997) estão normalmente muito acima da CMC.

#### *2.6.3.4.1. Vantagens e Desvantagens da Utilização do Sistema de Micelas Reversas em Catálise Enzimática*

O sistema de micelas reversas tem sido utilizado como meio aquo-restrito pelo fato de apresentar algumas vantagens (Carvalho e Cabral, 2000), como: a) as estruturas micelares são relativamente ordenadas e se formam espontaneamente, alcançando o estado de equilíbrio em pouco tempo; b) micelas normais e reversas são consideradas como modelos de estruturas biológicas (Martinek *et al.*, 1986); c) proporcionam solubilização de substratos e produtos hidrofílicos e hidrofóbicos; d) a esterificação pode ser favorecida através da diminuição do  $W_0$ ; e) contaminação microbiana diminui; f) aumento da área interfacial (10-100 m<sup>2</sup>.mL<sup>-1</sup>); g) a atividade e estabilidade enzimática podem melhorar, h) proporcionam um ambiente adequado para a enzima, protegendo-a da desnaturação pelos solventes orgânicos, pois possibilitam a existência de um teor mínimo de água, necessário ao funcionamento do biocatalisador (Orlich e Schomäcker, 2001; Stamatis *et al.*, 1999).

#### *2.6.3.4.2. Fatores que Influenciam na Biocatálise em Micelas Reversas*

Vários fatores do sistema reacional e da enzima, como pH da solução enzimática, concentração do substrato, concentração do surfactante, aditivos, temperatura e tipo de solvente orgânico, bem como, os co-solventes, podem ser estudados na enzimologia micelar (Carvalho e Cabral 2000). Dentre eles, o parâmetro  $W_0$  é um dos de maior importância, pois é através dele que se pode controlar o teor de água no meio reacional.

Em enzimologia micelar, o parâmetro que define o teor de água do sistema ( $W_0$ ) é definido como a razão entre a concentração em quantidade de matéria de água e a concentração em quantidade de matéria do surfactante, segundo a equação 2.

$$W_0 = [\text{H}_2\text{O}] / [\text{surfactante}] \quad (2)$$

Este parâmetro determina a maioria das propriedades físicas e estruturais das micelas, assim como o número de moléculas de surfactante por micela e o raio micelar, ou seja, o seu tamanho. O valor ótimo de  $W_0$  para a catálise depende de muitos aspectos. Um deles é o tamanho da enzima em relação ao da micela, uma vez que o espaço disponível para acomodar a proteína influencia na conformação adquirida dentro da micela. Um comportamento comumente verificado é que o  $W_0$  ótimo corresponde ao tamanho micelar comparável ao tamanho da proteína (Carvalho e Cabral, 2000). O raio da micela pode ser calculado pela equação 3 (Luisi *et al.*, 1988):

$$r \text{ (Å)} = 1,64 W_0 \quad (3)$$

Esta equação aplica-se com boa aproximação ao sistema AOT/Isooctano, e foi confirmada por estudos de Raios-X, por dispersão da luz, por ultracentrifugação e por ressonância nuclear magnética (RNM) (Castro e Cabral, 1988). A água intramicelar pode ter propriedades físico-químicas distintas da água pura, assemelhando-se a água presente nas membranas e interfaces biológicas. Goto *et al.* (1995) estudaram a solubilização da água no sistema de micelas reversas AOT/solvente, classificando a água intramicelar como água imobilizada, água de hidratação e água livre. Abaixo de  $W_0$  2, existe apenas água imobilizada, ao passo que na faixa de 4-10, a água hidrata os grupos polares do AOT e finalmente a presença de água livre é verificada para valores de  $W_0$  acima de 10. A maioria das enzimas, especialmente as lipases, tem atividade ótima em reações de hidrólise em  $W_0$  entre 10 a 15 (Pandey *et al.*, 1999; Vulfson, 1994; Chang e Rhee, 1990; Han e Rhee, 1986). Para reações de síntese, entretanto, este valor de  $W_0$  pode ser consideravelmente menor. Aires-Barros (1990) obteve uma atividade máxima em reação de esterificação entre  $W_0$  5,6 e 6,7 para a lipase de *C. viscosum*, solubilizada em micelas reversas AOT/Isooctano, enquanto que a lipase de *M. miehei* exibiu um máximo de atividade a  $W_0$  4. Crooks *et al.* (1995) obtiveram atividade de esterificação máxima em  $W_0$  10 para a lipase de *R. miehei* no sistema de microemulsão AOT. Nagayama *et al.* (1998) estudaram a reação de esterificação do ácido oleico com octanol catalisada pela lipase de *R. delemar* em sistema de microemulsão e obtiveram atividade máxima em  $W_0$  4,5 no sistema de lecitina e  $W_0$  7,5 no sistema contendo AOT.

Como mostrado pela equação 3, a concentração do surfactante é inversamente proporcional ao parâmetro  $W_0$ . Um aumento da concentração do surfactante, mantendo-se a mesma concentração de água, causa um decréscimo no tamanho micelar, enquanto

que adicionando-se uma maior quantidade de água e mantendo-se a mesma concentração de surfactante, tem-se um aumento do tamanho micelar (Carvalho e Cabral, 2000).

A atividade das enzimas em sistema de micelas reversas, como em soluções aquosas, é dependente do pH. Em sistemas de micelas reversas normalmente assume-se que o pH no interior da micela corresponde ao pH da fase aquosa inicial (Carvalho e Cabral, 2000; Krieger *et al.*, 1997b; Smith e Luisi, 1986). Entretanto, as alterações da água presente na micela podem causar variações de pH e portanto, o pH intramicelar está relacionado com o parâmetro  $W_0$ . Além disso, os grupos ionizáveis da enzima são afetados pelo microambiente micelar e o estado de ionização destes grupos influencia na interação da enzima com substratos e produtos (Petersen *et al.*, 1998).

Em sistemas micelares, a maioria das lipases apresenta um comportamento frente ao substrato dito de “Michaelis-Menten” (uma hipérbole retangular quando a velocidade inicial da reação é plotada contra a concentração inicial de substrato). A abordagem de Michaelis-Menten, entretanto, apresenta limitações no que se refere a análise completa do curso da reação, uma vez que não se consegue prever a formação real de produtos ao longo do tempo em alguns casos (Prazeres, 1992). Uma das características das reações hidrolíticas catalisadas por algumas lipases em sistemas de micelas reversas, é o decréscimo da atividade ao longo do tempo. As causas deste comportamento ainda não estão esclarecidas, sendo consideradas como prováveis a inibição pelo produto, os efeitos de equilíbrio químico e a desativação enzimática. O primeiro destes efeitos foi identificado relativamente aos ácidos graxos liberados em meio aquoso e em sistema de micelas reversas (Tsai e Chiang, 1992).

A influência da temperatura sobre os biocatalisadores no sistema de micelas reversas é semelhante à do meio aquoso (Carvalho e Cabral, 2000; Krieger *et al.*, 1997b; Melo *et al.*, 1995; Prazeres *et al.*, 1992). Muitas reações químicas ocorrem a uma velocidade maior com o aumento da temperatura. As reações catalisadas por enzimas têm o mesmo tipo de comportamento, até um limite, onde o aumento da temperatura causa um aumento no número de choques, que é suficiente para desnaturar a proteína, pela modificação da sua estrutura catalítica. Neste ponto, o efeito de desnaturação sobrepõe-se ao aumento da atividade, causando uma diminuição da velocidade de reação.

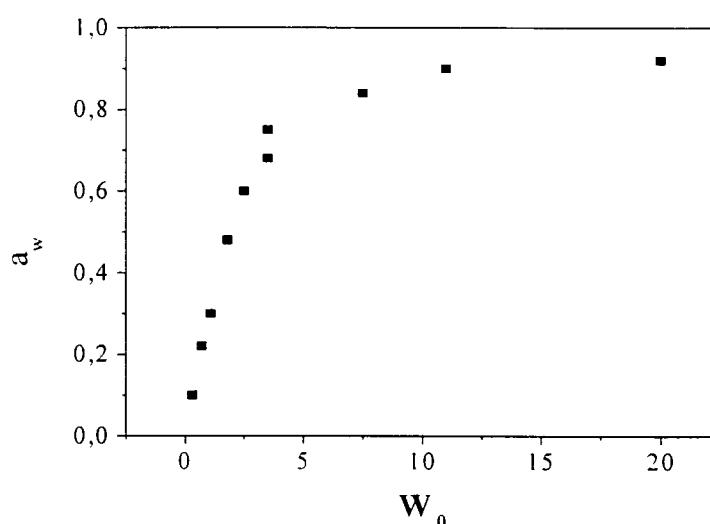
A influência do solvente com relação ao biocatalisador no sistema de micelas reversas tem o mesmo comportamento de sistemas orgânicos descrito em (2.6.1.2.). Os



solventes mais empregados nos sistemas de micelas reversas são: isooctano, ciclohexano, n-hexano, n-heptano e n-octano (Shipovskov *et al.*, 2003; Krieger *et al.* 1997; Svensson *et al.*, 1996; Bélaï *et al.*, 1994; Han e Rhee, 1986). Alcanos de cadeia pequena penetram mais fortemente sobre a camada do surfactante, reduzindo a solubilização da água e, portanto, não são muito utilizados (Hayes e Gulari, 1995).

#### 2.6.3.4.3. Relação entre $W_0$ e Atividade de Água ( $a_w$ )

Diagramas relatando a correspondência de  $a_w$  e  $W_0$  (Figura 12) foram publicados por Crooks *et al.* (1995) e Luisi *et al.* (1988). Para  $W_0$  de 2,7, o  $a_w$  é de aproximadamente 0,7 e para o  $W_0$  5, o  $a_w$  é de 0,8. Resultados com  $^1\text{H}$  RNM (espectroscopia de ressonância nuclear magnética) obtidos com diferentes conteúdos de água permitiram concluir que a existência de água livre ( $W_0 > 10$ ) é equivalente ao  $a_w$  1 (Goto *et al.*, 1995).



**Figura 12.** Relação entre  $W_0$  ( $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$ ) e atividade de água ( $a_w = p_w / p_w^\circ$ ). Fonte: Crooks *et al.* (1995).

#### 2.6.4. Reações de Esterificação Catalisadas por Lipases em Meios Aquo-Restritos

A literatura descreve algumas reações de esterificação em meios não convencionais ou aquo-restritos utilizando lipases (Tabela 1). A maioria dos exemplos utiliza como meio reacional solventes apolares, especialmente o n-hexano e o n-heptano (Abbas e Comeau, 2003; Castillo *et al.*, 2003; Kiran e Divakar, 2001). Entretanto, a utilização de enzima livre e em micelas reversas também é relatada em muitos trabalhos

(Xu *et al.*, 2002; Tweddell *et al.*, 1998; Nagayama *et al.*, 1998). É importante ressaltar que em geral, as reações de esterificação catalisadas por lipases são realizadas em temperaturas entre 30 a 50 °C, com tempo de reação de 6 a 192 h e são raros os casos onde se observa conversões acima de 80 % em 90 min, como é o caso da síntese do acetato de octanoíla (Castillo *et al.*, 2003) ou do laurato de etila, 90 % em 1 h (Fernandes, 2001b).

**Tabela 1.** Reações de esterificação catalisadas por lipases em diferente meios orgânicos.

<i>Fontes de Lipases</i>	<i>Sistemas</i>	<i>Condições</i>	<i>Substratos (ácido/álcool)</i>	<i>Rendimentos e Tempos das reações</i>	<i>Referências</i>
<i>C. antarctica</i>	n-heptano/ enzima imobilizada	30 °C	Acético e octanol	82 % (90 min)	Castillo <i>et al.</i> , 2003
<i>R. chinesis</i>	n-heptano/ enzima liofilizada	30 °C	Hexanóico e etanol	96,2 % (72 h)	Xu <i>et al.</i> , 2002
<i>T. lanuginosa</i>	AOT/Isooctano (micelas reversas)	30 °C W <sub>0</sub> 10	Láurico e etanol	90 % (1 h)	Fernandes, 2001b
<i>R. miehei</i>	Clorofórmio/10% tampão/ enzima imobilizada	50 °C	Palmitico e láctico	44,5 (48 h)	Kiran e Divakar, 2001
<i>R. miehei</i>	n-heptano/ enzima imobilizada com 10 % de água (m/m)	40 °C	Acético e álcool isoamílico	95 % (72 h)	Krishna <i>et al.</i> , 2001
<i>R. niger</i>	Hexano/ 10 % água, Tween 60 e Span 60/ enzima liofilizada	30 °C	Oleico e etanol	> 80 % (6 h)	Tweddell <i>et al.</i> , 1998
<i>R. niger</i>	Hexano/ 20 % água/ enzima liofilizada	30 °C	Oleico e etanol	> 80 % (12 h)	Tweddell <i>et al.</i> , 1998
<i>R. niger</i>	Hexano/ a <sub>w</sub> 0,75/ enzima liofilizada	30 °C	Oleico e etanol	60 % (192 h)	Tweddell <i>et al.</i> , 1998
<i>R. delemar</i>	Isooctano/ Fosfatidilcolina/ enzima liofilizada	30 °C W <sub>0</sub> 4,5	Oleico e octanol	90 % (24 h)	Nagayama <i>et al.</i> , 1998
<i>R. delemar</i>	AOT/Isooctano enzima liofilizada	30 °C W <sub>0</sub> 7,5	Oleico e octanol	90 % (24 h)	Nagayama <i>et al.</i> , 1998
<i>P. fluorescens</i>	Dietil/ etanol (1:1)/ 3,4 % água/ Enzima liofilizada	37 °C	Oleico e n-butanol	94,9 % (24 h)	Wu <i>et al.</i> , 1996

Qualquer sistema aquo-restrito, se comparado ao meio aquoso, aumenta a rigidez conformacional da enzima (Ahmad *et al.*, 1998) o que permite, muitas vezes, um aumento da estabilidade (Zaks e Klibanov, 1988a), atividade, especificidade e

enantiosseletividade (Dudal *et al.*, 1995; Langrand *et al.*, 1990; Zaks e Klivanov, 1988b). Cada sistema apresenta vantagens e desvantagens relacionadas à recuperação do produto e do biocatalisador e à manutenção da enzima cataliticamente ativa. Com relação aos sistemas utilizados neste trabalho, por exemplo, o sistema de micelas reversas apresenta vantagens como proporcionar condições para manter a enzima ativa no meio orgânico através do micrencapsulamento, possuir grande área interfacial e ser termodinamicamente estável. Porém, alguns surfactantes podem inibir a atividade enzimática, e o processo de recuperação da enzima e do produto do meio reacional pode ser dificultado pela presença do tensoativo (Carvalho e Cabral, 2000; Krieger *et al.*, 1997b). O sistema meio reacional/enzima livre, com controle do teor de água, tem a vantagem na recuperação do produto, mas dificulta a recuperação da enzima; a manutenção da enzima cataliticamente ativa por meio da camada de hidratação muitas vezes é influenciada pelos substratos, que quando polares, podem facilitar na remoção desta camada e diminuir a atividade enzimática. Com o sistema onde se utiliza enzima imobilizada, é possível a recuperação do produto e do biocatalisador. Além disso, o processo de imobilização pode resultar em maior estabilidade do biocatalisador. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade da imobilização resultar numa mudança conformacional da enzima, diminuindo sua atividade (Ikeda e Kurokawa, 2002; Kilinç *et al.*, 2002).

A escolha de um sistema aquo-restrito depende, não somente da compatibilidade de reagentes no meio reacional, mas principalmente do comportamento da enzima neste sistema. A comparação entre os diversos tipos encontrados na literatura (Sellek e Chaudhuri, 1999) torna-se possível quando se estuda uma reação modelo utilizando o mesmo biocatalisador, em diferentes sistemas.

### **3. OBJETIVOS**

---

O objetivo deste trabalho foi estudar a biocatálise em sistemas bifásicos micro-heterogêneos e macro-heterogêneos utilizando-se lipases fúngicas. Para tanto, foram estudadas a reação de hidrólise de ésteres em meio aquoso e em micelas reversas, bem como, a síntese do oleato de n-butila nos diferentes sistemas.

Para alcançar tal objetivo, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Produzir lipases fúngicas por fermentação submersa, em meio de cultivo de custo relativamente baixo;
- Estudar algumas características do extrato lipolítico, com vista à utilização nos diferentes sistemas, a saber: efeito do pH e da temperatura para atividade máxima, estabilidade à temperatura, estabilidade em solventes polares e apolares, realizar estudos de imobilização do extrato lipolítico, para utilização nos sistemas orgânicos.
- Comparar os tipos de meios reacionais orgânicos empregados na síntese do oleato de n-butila (utilizada como reação modelo), a saber: sistemas de micelas reversas (micro-heterogêneos) e em sistemas macro-heterogêneos (bifásicos, micro-aquosos) empregando n-heptano/enzima liofilizada, n-heptano/enzima liofilizada com  $\beta$ -ciclodextrina e n-heptano/enzima imobilizada.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

#### 4.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram grau analítico.

#### 4.2. Microrganismo

O fungo *P. corylophilum* foi isolado no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise-UFPR e sua caracterização taxonômica foi realizada no Laboratório de Coleção de Cultura de Fungos da Fundação Oswaldo Cruz, onde está depositado como *P. corylophilum* Dierckx (IOC-4211).

#### 4.3. Enzima

Utilizou-se o extrato lipolítico produzido por *P. corylophilum*, preparado conforme descrito no item 4.9.

#### 4.4. Preservação da Cepa

Utilizou-se o meio BDA (batata, dextrose e ágar), que foi previamente esterilizado e adicionado em placas de Petri; o fungo foi repicado em três regiões diferentes da placa (Figura 13) e incubado a 29 °C. Depois do seu crescimento (normalmente 7 dias), cortou-se, com o auxílio de um canivete, pequenos cubos do gel. Em um recipiente pequeno, com água destilada estéril, num volume de aproximadamente 5 mL, ou o suficiente para cobrir que a metade do frasco, foram colocados cerca de quatro pequenos cubos de ágar retirados da placa. Este recipiente foi fechado e mantido a 4 °C.



**Figura 13.** Fungo *Penicillium corylophilum* em meio BDA. Crescimento após 7 dias, a 29 °C.

#### 4.5. Esterilização dos Meios

Para garantir as condições estéreis de crescimento do fungo, dos meios sólidos de propagação, dos meios líquidos do pré-inóculo e fermentação, assim como todos os materiais utilizados, foram feitas esterilizações em autoclave a 120 °C durante 15 min.

#### 4.6. Composição dos Meios

A composição dos meios de cultivo utilizados neste trabalho e denominados de meio com fontes complexas de carbono e nitrogênio (1) e meio com fonte inorgânica de nitrogênio (2), convencionalmente chamados de meio complexo e meio inorgânico respectivamente, está apresentada na Tabela 2.

A relação de carbono/nitrogênio (C/N) dos meios foi de 2 para o meio 1 e 35 para o meio 2.

**Tabela 2.** Composição dos meios de cultivo.

<i>Composição</i>	<i>Meio de Cultivo 1 (% m/v)</i>	<i>Meio de Cultivo 2 (% m/v)</i>
KNO <sub>3</sub>	0,200	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,050	0,073
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,100	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,000	0,067
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,043	0,010
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,110	0,0007
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,015	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,250	0,000
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,000	0,130
Glucose	0,000	0,067
Óleo de oliva	1,000	2,000
Peptona de carne	2,000	-
Extrato de levedura	0,500	-

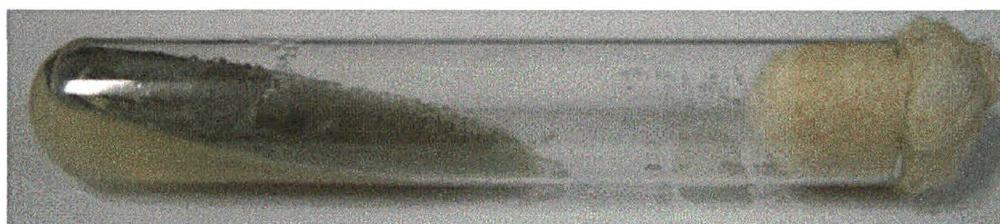
#### 4.7. Condições de Cultivo

Para o meio de cultivo 1, a cultura foi iniciada com o repique do fungo através da adição de um cubo de BDA contendo o fungo crescido, conforme item 4.4, no centro do



tubo inclinado contendo meio sólido BDA (Figura 14). Após crescimento de 7 dias a 29 °C, foi preparada uma solução aquosa de esporos com concentração na ordem de  $10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup>; 1 mL desta solução foi adicionado a um Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio, e deixado por 48 h a 29 °C, a 120 rpm (pré-inóculo). Após este tempo, o pré-inóculo foi assepticamente transferido para um Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio de cultura e incubado durante 72 h a 29°C e 120 rpm.

Para o meio de cultivo 2, preparou-se uma solução aquosa de esporos com concentração na ordem de  $10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup>; 1 mL desta solução foram adicionados a um Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio, exceto o óleo de oliva, e deixado por 24 h a 29 °C, a 120 rpm (pré-inóculo). Após este tempo, o pré-inóculo foi assepticamente transferido para um Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de água estéril e 2 % (v/v) de óleo de oliva. Para ambos os meios, coletou-se amostras em diferentes intervalos de tempo, filtrando-as com gaze para a separação das células. O sobrenadante foi utilizado para investigação da atividade lipolítica, concentração de proteínas e determinação do pH.



**Figura 14.** Repique do fungo *Penicillium corylophilum* em tubo inclinado (meio de crescimento, BDA). Tempo de crescimento: 7 dias.

#### 4.8. Cinética de Crescimento do Microrganismo

Após a escolha do meio adequado para a produção de lipases por *P. corylophilum*, realizaram-se experimentos para investigação da sua cinética de crescimento. As fermentações descontínuas (“batch”) foram realizadas com o meio 2, como descrito no item 4.6 e interrompidas nos tempos requeridos (normalmente a cada 24 h). A avaliação do crescimento foi feita pela determinação da biomassa (4.8.1) e a fermentação foi acompanhada ao longo de 8 dias, sem contar o tempo de pré-inóculo. A taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) e o tempo de duplicação ( $t_d$ ) foram calculados na fase exponencial de crescimento, a partir equações 4 e 5 (Pirt, 1975):

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t - t_0} \quad (4)$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (5)$$

onde:  $\mu$  = taxa específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ );

$X$  = Biomassa final (g);

$X_0$  = Biomassa inicial (g);

$t$  = tempo final (h);

$t_0$  = tempo inicial (h).

#### **4.8.1. Determinação da Biomassa Fúngica**

A determinação da biomassa foi feita através dos pesos secos das células obtidas com diferentes tempos de fermentação. O micélio foi separado do sobrenadante de cultura por filtração em papel Whatmann nº 4, e em seguida, lavado com água destilada por 4 vezes. As células lavadas foram secas ( $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) em estufa, normalmente por 48 h (até peso constante), e pesadas em balança analítica.

#### **4.8.2. Produtividade Volumétrica da Enzima**

A determinação da produtividade foi calculada de acordo com a equação 6.

$$P = A / t \quad (6)$$

onde:

$P$ : produtividade volumétrica da enzima;

$A$ : atividade ( $\text{U.mL}^{-1}$ ) máxima durante a fermentação;

$t$ : tempo de cultivo (h) onde a atividade é máxima.

#### **4.9. Obtenção do Extrato Bruto**

O extrato bruto precipitado com sulfato de amônio (extrato lipolítico) foi utilizado durante todo o trabalho nos estudos de estabilidade em solventes polares e apolares e, na biocatálise. O extrato precipitado foi armazenado a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (na forma liofilizada e em

solução), com adição de 0.01 % (m/v) de azida sódica e foi obtido como descrito a seguir.

As fermentações para a produção de lipases por *P. corylophilum* foram realizadas em frascos sob agitação nas condições otimizadas previamente com o meio 2. A pré-purificação do extrato bruto foi realizada através da precipitação com sulfato de amônio até 80 % de saturação, sendo esta etapa o primeiro passo normalmente empregado em diversos trabalhos para a purificação de lipases (Shrama *et al.*, 2001; Chahinian *et al.*, 2000; Krieger, 1995). Foram tomados 250 mL do sobrenadante da cultura e resfriados a 0 °C em banho de gelo. Adicionou-se quantidade de sulfato de amônio requerida para saturação de 80 %, lentamente e sob agitação branda. Após a adição do sal manteve-se o extrato sob agitação a 4 °C por 12 h. Em seguida centrifugou-se 10.000 g por 15 min. O sobrenadante foi recolhido e o precipitado foi ressuspenso em volume mínimo de tampão (1 a 3 mL para cada 100 mL de extrato precipitado) fosfato pH 7.0, 50 mmol.L<sup>-1</sup> e dialisado por 12 h contra o mesmo tampão, com duas trocas, sob agitação branda, a 4 °C. Os sacos de diálise empregados tinham diâmetro de poro que permitiu a saída de proteínas com pesos moleculares inferiores a 12.000 Da. As frações dialisadas foram submetidas a dosagens de atividade lipolítica e proteínas.

#### **4.10. Caracterização do Extrato Lipolítico**

O conjunto de experimentos descrito a seguir foi realizado com o objetivo de determinar-se as melhores condições para utilização do extrato lipolítico em biocatálise, tanto em meio aquoso, como em meios aquo-restritos. Assim, não se pretendeu realizar estudos cinéticos enzimáticos clássicos, uma vez que a enzima ainda não estava purificada.

##### **4.10.1. Reações em Meio Aquoso**

Nas reações em meio aquoso, o biocatalisador foi adicionado ao meio reacional na forma de extrato lipolítico como descrito no item 4.9 ou nas formas liofilizada, co-liofilizada com  $\beta$ -ciclodextrina e liofilizada em presença de cloreto de potássio. Em todos os itens descritos abaixo, após o procedimento, a atividade foi medida através da hidrólise do pNPP em meio aquoso, conforme descrito no item 4.13.1.1.

#### 4.10.1.1. Estabilidade à Liofilização

Para verificar a estabilidade do extrato lipolítico à liofilização, alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  ( $20,1 \pm 1,2 \text{ U.mL}^{-1}$ ) do extrato enzimático foram colocadas em tubos eppendorfs e liofilizadas em diferentes tempos (45, 60, 75 e 90 min). A liofilização foi realizada em liofilizador Jouan LP3<sup>®</sup> modelo 60, a  $-46^\circ\text{C}$ , sob vácuo.

#### 4.10.1.2. Liofilização em Presença de $\beta$ -Ciclodextrina

O extrato lipolítico foi liofilizado em presença de  $\beta$ -ciclodextrina com a finalidade de verificar o efeito deste composto na manutenção da atividade enzimática durante a liofilização, uma vez que é relatado que pode proteger a enzima da desnaturação durante o processo (Hasegawa *et al.*, 2003). O extrato lipolítico foi liofilizado em presença de  $\beta$ -ciclodextrina, adicionando-se extrato bruto (1,27 mL ou 1,25 mg de proteína) a 10 mL de tampão fosfato pH 7,0; 50  $\text{mmol.L}^{-1}$  e 25 mg de  $\beta$ -ciclodextrina.

#### 4.10.1.3. Liofilização em Presença de Cloreto de Potássio

De acordo com a literatura (Persson *et al.*, 2002b), a adição de KCl pode favorecer na estabilidade enzimática ou induzir uma ativação enzimática com a utilização do sal durante o processo de liofilização. Para tanto, a quantidade de KCl estudada (1 a 20 %, m/v) foi adicionada a 140  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato pH 7,0, 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ , contendo 10  $\mu\text{L}$  do extrato bruto ( $20 \text{ U.mL}^{-1}$  e  $0,739 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e liofilizou-se por 30 min.

#### 4.10.1.4. Efeito do pH

A faixa de pH estudada foi de 5,0 a 10,0, com os seguintes tampões: citrato-fosfato (pH 5,0 e 6,0); fosfato (pH 6,0; 7,0 e 8,0); Tris-HCl (8,0 e 9,0) e carbonato-bicarbonato (pH 9,0 e 10,0), todos com força iônica de 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ .

A solução B do método do pNPP (item 4.13.1.1.) e as curvas de calibração foram preparadas nos diferentes tampões, pois o produto da reação, o *p*-nitrofenol, intensifica a cor com o aumento do pH. A concentração de proteínas da solução enzimática ( $0,013 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e a concentração de substrato ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foram mantidas constantes em todos os experimentos, exceto no experimento com tampão fosfato pH 8,0 cuja concentração de proteínas foi de  $0,0097 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

#### 4.10.1.5. Efeito da Temperatura

Para determinação da melhor temperatura para a atividade da enzima os ensaios de atividade foram realizados fazendo-se variar a temperatura entre 30 a 60 °C. Os ensaios foram realizados em tampão fosfato pH 7,0, 50 mmol.L<sup>-1</sup>, com concentrações de substrato e enzima constantes em todos os experimentos (0,3 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,013 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente).

#### 4.10.1.6. Estabilidade à Temperatura

Para a determinação da estabilidade térmica da enzima em sistema aquoso, contendo tampão fosfato pH 7,0, 50 mmol.L<sup>-1</sup>, as amostras do extrato bruto precipitado foram incubadas em temperaturas de 37 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C, por 30 min.

#### **4.10.2. Atividade Enzimática Frente a Diferentes Substratos e Sistemas**

A atividade enzimática do extrato lipolítico foi determinada utilizando-se meio aquoso e sistema de micelas reversas.

Para o sistema aquoso, a atividade foi dosada através do método espectrofotométrico (item 4.13.1.1.) frente ao substrato de cadeia longa pNPP (16), normalmente utilizado como ensaio para lipases, e frente a outros ésteres do *p*-nitrofenol: acetato (C 2), butirato (C 4) e caproato (C 6) de *p*-nitrofenila, para detecção de atividade esterásica no extrato (Kordel *et al.*, 1991). Foram feitos ainda ensaios utilizando-se a trioleína (C 18:1), com o método titulométrico descrito em 4.13.1.2.

Com o sistemas de micelas reversas, a hidrólise foi realizada em presença do pNPP e da trioleína. A atividade foi dosada através do método de Lowry-Tinsley (item 4.13.2.1).

#### **4.10.3. Reações de Hidrólise e Esterificação em Meio Aquo-Restrito**

Neste trabalho convencionou-se que todos os meios onde o solvente não é a água sejam chamados de “meios aquo-restritos” ou “meio orgânico”. Nas reações de hidrólise o biocatalisador foi adicionado ao meio reacional na forma de extrato lipolítico como descrito no item 4.9 e nas reações de esterificação em meio aquo-restrito, o extrato lipolítico precipitado foi liofilizado (com e sem a presença de  $\beta$ -ciclodextrina, como descrito em 4.10.1.2 ou imobilizado e liofilizado como descrito nos itens a seguir.

#### 4.10.3.1. Liofilização do Extrato Bruto

As reações de esterificação, tanto no meio micelar, quanto no meio com adição direta da enzima, foram realizadas com o extrato bruto precipitado com sulfato de amônio previamente liofilizado, para que houvesse uma quantidade mínima de água e para permitir o controle da  $a_w$  do material nos experimentos onde isto foi requerido. A secagem foi realizada em liofilizador Jouan LP3<sup>®</sup> modelo 60, durante aproximadamente 24 h.

#### 4.10.3.2. Imobilização Enzimática

O biocatalisador foi imobilizado utilizando como suporte o gel de *Octyl Sepharose 4 Fast Flow* (Amersham-Pharmacia Biotech). Neste caso, a imobilização ocorre por adsorção interfacial da proteína pelo suporte. O gel é constituído por esferas de 200  $\mu\text{m}$  de diâmetro contendo 40  $\mu\text{mol}$  de grupos de octil por mL do suporte (Bastida *et al.*, 1998).

O gel, que se encontrava em solução alcóolica 20 % (v/v), foi previamente lavado com tampão fosfato pH 7,0, 50  $\text{mmol.L}^{-1}$  (2 vezes). Centrifugou-se a 12.000 g por 3 min à temperatura ambiente, para facilitar a retirada do tampão. A imobilização foi realizada adicionando-se 3,5  $\mu\text{g}$  (6  $\mu\text{L}$ ) de proteína por mg de suporte. Após retirada do sobrenadante por centrifugação (12.000 g, 3 min), o suporte foi lavado com tampão fosfato pH 7,0, 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ , 3 vezes; a solução resultante da lavagem foi submetida à determinação da atividade enzimática para verificar se houve dessorção da proteína do suporte.

Realizou-se ainda a cinética de imobilização do extrato lipolítico em presença do suporte *Octyl Sepharose*, bem como a saturação do suporte pela enzima como descrito a seguir.

- a) Cinética de imobilização: teve como objetivo determinar o tempo de contato entre o extrato lipolítico e o suporte para atingir-se uma quantidade de enzima imobilizada próxima a 100 %, o que foi verificado pela ausência de atividade no sobrenadante após a imobilização. Quantidades de 3,5  $\mu\text{g}$  de proteína por mg de suporte, tipicamente 6  $\mu\text{L}$  do extrato lipolítico diluído em 394  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato pH 7,0, 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ , foram colocadas em eppendorf de 1 mL e após 5, 10, 15, 20, 30 e 60 min. sob agitação branda, a mistura foi

centrifugada (12.000 g e 3 min) para facilitar a retirada do sobrenadante. A atividade residual do sobrenadante, medida pelo método do pNPP, foi expressa em porcentagem de atividade inicial.

- b) Saturação do suporte: quantidades crescentes de proteínas (3 a 20 µg) por mg de suporte, tipicamente 3 a 32 µL de extrato lipolítico diluídos em tampão fosfato pH 7,0, 50 mmol.L<sup>-1</sup> até concentração requerida, foram adicionadas em eppendorfs de 1 mL e após 60 min, sob agitação branda em vórtex, a mistura foi centrifugada (12.000 g, 3 min) para facilitar a retirada do sobrenadante. A atividade residual do sobrenadante foi medida pelo método do pNPP e expressa em porcentagem de atividade inicial.

A partir dos resultados experimentais foram calculados os parâmetros do processo de imobilização E (Eficiência da imobilização), R<sub>1</sub> (Rendimento da imobilização) e R<sub>2</sub> (Retenção da atividade), a partir das equações 7, 8 e 9 respectivamente:

$$E = (At_i - At_f) \cdot 100 / At_i \quad (7)$$

$$R_1 = A_r \cdot 100 / At_i \quad (8)$$

$$R_2 = A_R \cdot 100 / A_T \quad (9)$$

Sendo: At<sub>i</sub> : atividade inicial (U) total;

At<sub>f</sub>: atividade final (U) total no sobrenadante após a imobilização;

A<sub>R</sub> : atividade real do imobilizado (U.mg<sup>-1</sup> do suporte);

A<sub>T</sub> : atividade teórica do imobilizado (U.mg<sup>-1</sup> do suporte).

#### 4.10.3.3. Encapsulamento em Micelas Reversas

O microencapsulamento das lipases nos sistemas de micelas reversas foi feito através do método de injeção (Krieger *et al.*, 1997), utilizando-se o sistema AOT/n-heptano. O biocatalisador liofilizado foi ressuspenso em tampão fosfato pH 7,0, 50 mmol.L<sup>-1</sup> e injetado em solução 100 mmol.L<sup>-1</sup> de AOT, seguindo-se de agitação em vórtex até obtenção de solução micelar cristalina (normalmente 30 s). Volumes

adequados da solução enzimática foram injetados na solução AOT/n-heptano até o  $W_0$  requerido no experimento (5, 10 ou 15).

#### 4.11. Estudos de Estabilidade em Solventes Orgânicos

Este estudo foi realizado com a finalidade de eleger um solvente como meio reacional para realização da reação de esterificação em presença da enzima liofilizada e imobilizada e também para o sistema de micelas reversas. A concentração de proteínas no meio reacional foi mantida constante ( $7,23 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para todos os ensaios de estabilidade em solventes orgânicos.

##### 4.11.1. Estabilidade em Solventes Polares

A estabilidade em solventes orgânicos polares foi realizada com diferentes proporções de cada solvente. Para tanto, 30 ( $3,49 \text{ U.mL}^{-1}$  e  $120,76 \text{ U.mg}^{-1}$ )  $\mu\text{L}$  do extrato bruto, foi adicionado em 90  $\mu\text{L}$  de solução tampão (fosfato pH 7,0,  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) /solvente orgânico, em proporções de 10, 20, 40, 60 e 75 % (v/v) dos solventes: etanol, isopropanol, butanol e acetona. Após, incubou-se por 30 min, a  $37^\circ\text{C}$ , sem agitação. Em seguida coletou-se 100  $\mu\text{L}$  da solução e mediu-se a atividade através da hidrólise do pNPP em meio aquoso.

##### 4.11.2. Estabilidade em Solvente Apolares em Diferentes $a_w$

A estabilidade em solventes apolares foi realizada em presença de n-hexano, n-heptano, isooctano e tolueno. Nestes ensaios utilizou-se o extrato lipolítico imobilizado, conforme descrito em 4.10.3.2, para possibilitar a transferência da enzima do meio orgânico apolar para o meio aquoso, onde foi determinada a atividade residual. A utilização dos solventes apolares também possibilitou o controle do teor de água no sistema ( $a_w$ ), conferido pela estabilização da enzima e dos solventes empregados, em presença de soluções saturadas de sais. Assim, os solventes e a enzima previamente imobilizada e liofilizada ( $481,5 \text{ U.mg}^{-1}$ , medida em meio aquoso) foram colocados em um eppendorf de 1 mL. Em seguida, ambos separadamente foram colocados em um recipiente de vidro, hermeticamente fechado. Para atingir a atividade de água requerida ( $a_w$ ), incubou-se a  $20^\circ\text{C}$ , durante 16 h, em presença de diferentes soluções salinas saturadas (Chowdary e Prapulla, 2002; Vulson *et al.*, 2000). Os sais empregados foram



LiCl ( $a_w$  0,11);  $Mg(NO_3)_2$  ( $a_w$  0,5) e  $KNO_3$  ( $a_w$  0,95). Após este tempo, adicionou-se 100  $\mu$ L do solvente à enzima e incubou-se a 37 °C por 30 min sem agitação. Após a incubação no respectivo solvente, o material foi lavado (2 vezes) com tampão fosfato pH 7,0; 50 mmol.L<sup>-1</sup>, em seguida centrifugado a 11.600 g por dois min; retirou-se a fase orgânica e o tampão e finalmente, foi determinada a atividade residual da enzima pelo método do pNPP em meio aquoso.

#### **4.12. Condições Reacionais para as Reações de Hidrólise e Esterificação em Meio Aquo-Restrito**

No sistema micro-heterogêneo (micelas reversas), após o microencapsulamento das lipases como descrito no item 4.10.3.3, iniciou-se a reação com adição dos reagentes.

No sistema macro-heterogêneo (bifásico) n-heptano/enzima liofilizada, co-liofilizada com  $\beta$ -ciclodextrina e imobilizada, o solvente, os reagentes e o biocatalisador liofilizado foram equilibrados, previamente à utilização, em determinados valores de  $a_w$ , como descrito no item 4.11.2.

Nas reações de hidrólise, realizadas somente no sistema de micelas reversas, a reação foi iniciada com a adição do pNPP ou da trioleína, com concentração enzimática constante (0,0045 mg.mL<sup>-1</sup>).

Nas reações de esterificação, em todos os sistemas, iniciou-se a reação com a adição do álcool e em seguida, do ácido carboxílico. A concentração enzimática foi mantida constante (0,38 mg.mL<sup>-1</sup>). A síntese foi realizada em Erlenmeyers de 25 mL, com volume de 5 mL, a 37 °C e com agitação orbital de 200 rpm. O curso das reações, foi seguido retirando-se alíquotas de 100  $\mu$ L em diferentes intervalos de tempo. A determinação da atividade enzimática de hidrólise ou de esterificação, foi de acordo com o método do pNPP em meio orgânico (4.13.3.2.2.) e o de Lowry-Tinsley (4.13.2.1.). Para as reações de esterificação, amostras de 3 mL, tomadas no final da reação, foram armazenadas a -20 C°, para posterior análise por CLAE (4.13.5.)

### 4.13. Métodos Analíticos

#### 4.13.1. Dosagem de Atividade Lipolítica em Meio Aquoso

##### 4.13.1.1. Hidrólise do pNPP

Este método espectrofotométrico, utilizado ao longo de todo trabalho, foi inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979), sendo modificado por Lima (2000). Baseia-se na hidrólise do pNPP (Figura 15) pela enzima, em meio aquoso, contendo como surfactante a goma arábica e o Triton X-100. A liberação do *p*-nitrofenol, de coloração amarela, é seguida a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$  de *p*-nitrofenol. O coeficiente de extinção molar do pNPP, calculado a partir de uma curva de calibração com o *p*-nitrofenol ( $0,978 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorvância obtida na leitura.

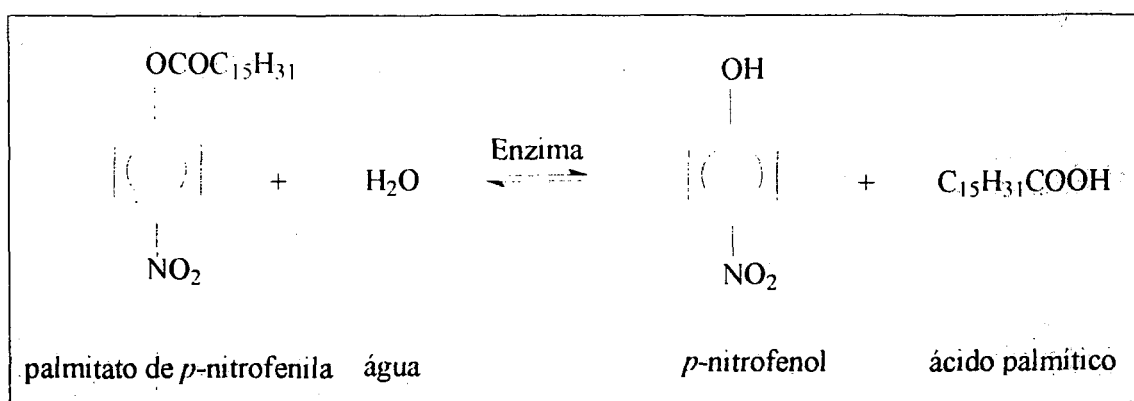


Figura 15. Representação da reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila.

#### Soluções utilizadas

- Solução A: pNPP em isopropanol ( $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ );
- Solução B:  $4,44 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de Triton X-100 e  $1,11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de goma arábica em tampão fosfato  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (pH 7,0).

#### Procedimento (Padrão)

Misturou-se 0,1 mL da solução A com 0,9 mL da Solução B. A mistura foi feita imediatamente antes de seu uso já que o substrato é instável quando em solução aquosa. Desta solução, colocou-se 0,9 mL em uma cubeta (1,0 mL) com 0,1 mL do tampão (no

caso do branco) ou 0,1 mL da amostra. As medidas foram realizadas num espectrofotômetro Hewlett Packard 8452A<sup>®</sup> Diode Array Spectrophotometer, com banho termostatzado à temperatura de 37° C. A reação foi acompanhada a cada 20 s, durante um minuto.

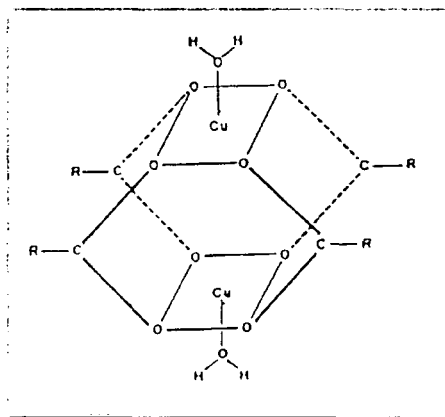
#### 4.13.1.2. Método Titulométrico

O método titulométrico, proposto por Stuer *et al.* (1986) baseia-se na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima sobre triglicerídeos com solução de NaOH (0,05 mol.L<sup>-1</sup>). Este método foi utilizado para dosar os ácidos graxos liberados na hidrólise das reações em meio aquoso.

#### 4.13.2. Dosagem de Atividade em Meio Orgânico

##### 4.13.2.1. Método de Lowry-Tinsley

Este método (Lowry e Tinsley, 1976) foi utilizado para quantificar os ácidos graxos produzidos pela hidrólise enzimática, utilizando-se a trioleína como substrato, e o teor residual de ácido oleico durante a síntese do oleato de n-butila catalisada pela enzima. Trata-se de um método colorimétrico que mede a coloração do complexo azul-esverdeado (715 nm) formado entre os íons Cobre II e os ácidos graxos livres (Figura 16), solúveis em fase orgânica. Uma unidade de atividade enzimática em reações de hidrólise e de síntese foi definida respectivamente como 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$  de ácido graxo produzido e consumido respectivamente. Os cálculos de concentração tiveram por base a curva de calibração do ácido oleico, preparada nas mesmas condições do ensaio.



**Figura 16.** Estrutura do complexo formado entre o íon  $\text{Cu}^{2+}$  e os ácidos graxos livres em solução.

Procedimento:

Adicionou-se 100 µl da amostra a ser analisada em tubos de ensaio contendo 1,15 mL de tolueno. Após agitação em vórtex por 20 s, adicionou-se o reativo de cor (250 µl), que consiste em uma solução aquosa de acetato de cobre II (5 %), com pH (6,0-6,2) acertado previamente com piridina. A mistura foi agitada em vórtex por 20 s e centrifugada por 10 min a 3000 g para separação das fases. A absorvância da fase orgânica foi lida a 715 nm.

4.13.2.2. Método do pNPP

Este método foi utilizado para quantificar o *p*-nitrofenol (pNP) produzido pela hidrólise enzimática do pNPP em meio orgânico (apolar), e se baseia na extração do pNP do meio orgânico para o meio aquoso básico (Pencreach e Baratti, 1996). Amostras de 100 µL foram coletadas em intervalos de tempos diferentes e adicionadas a 1800 µL de NaOH (0,1 mol.L<sup>-1</sup>) e 200 µL de isopropanol. Após agitação em vórtex por 30 s, a amostra foi centrifugada a 6000 g por 10 min. Fez-se a leitura da fase aquosa a 410 nm. Os cálculos de concentração tiveram por base a curva de calibração do pNP, preparada nas mesmas condições do ensaio.

**4.13.3. Determinação de Proteínas**

Método de Bradford: A dosagem de proteínas no extrato enzimático foi feita de acordo com o método de Bradford (1976). Este método utiliza o Comassie Brilliant Blue G-250, que existe em duas colorações diferentes, vermelho e azul. A forma vermelha é convertida a forma azul, funcionando como um corante para a proteína. A concentração de proteínas foi calculada a partir de uma curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina (BSA).

**4.13.4. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

Durante as reações de esterificação, alíquotas do meio reacional coletadas em diferentes intervalos de tempo foram aplicadas, com auxílio de um tubo capilar, em uma cromatoplaça contendo fluoreseceína (Merck). A fase móvel utilizada foi hexano: éter etílico (9:1). A presença do éster foi visualizada em câmara UV a 254 nm.

#### **4.13.5. Análise em CLAE**

As amostras contendo o éster oleato de n-butila (item 4.12) foram analisadas qualitativamente por CLAE em um sistema Shimadzu, modelo LC 10 AD, provido de um amostrador automático SIL 10 A com detector de índice de refração, modelo RID 10 A. Utilizou-se uma coluna C18 Micropak MCH 10, com fase móvel acetonitrila: acetona (9:1), vazão de  $0,9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , e  $40^\circ \text{C}$ .

#### **4.13.6. Análises Termogravimétricas**

As análises termogravimétricas (TGA) e termogravimétricas diferencial (DTA) foram realizadas com a finalidade de verificar a quantidade de água retida no extrato lipolítico após a liofilização e após o controle de  $a_w$ .

As análises foram realizadas usando um equipamento STA 409C NETZSCH. Amostras de 40 mg do extrato lipolítico liofilizado foram adicionadas em um cadinho de platina, aberto e em forno sob atmosfera de  $\text{O}_2$  e gás de arraste  $\text{N}_2$ , ambos a  $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . A faixa de aquecimento foi de  $20$  a  $300^\circ \text{C}$  usando gradiente de temperatura de  $10^\circ \text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ .

A região observada foi de  $156^\circ \text{C}$ , onde a massa da amostra permaneceu constante (final da perda de água adsorvida).

#### **4.13.7. Análises em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As análises em microscopia eletrônicas de varredura foram realizadas com a finalidade de verificar alterações conformacionais no suporte antes e após a imobilização, bem como, após sua utilização nas reações em meio aquo-restrito. A técnica permite visualizar o material superficialmente, aproximadamente  $10 \text{ nm}$  de espessura. As análises foram realizadas com  $0,5 \text{ mg}$  de suporte previamente seco. Para obter a imagem da superfície foi necessário depositar um filme de ouro sobre o suporte.

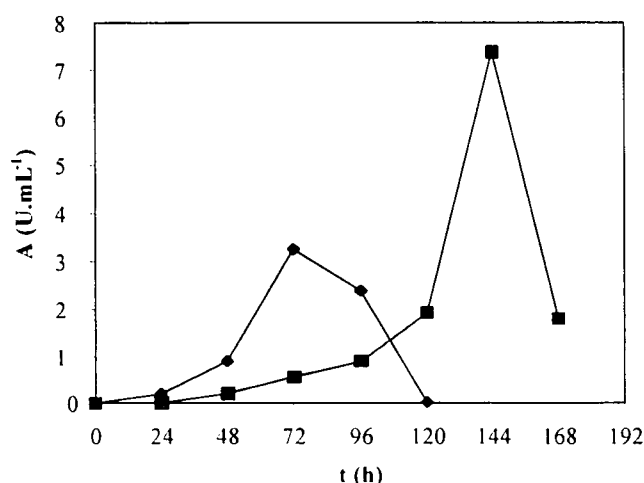
## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

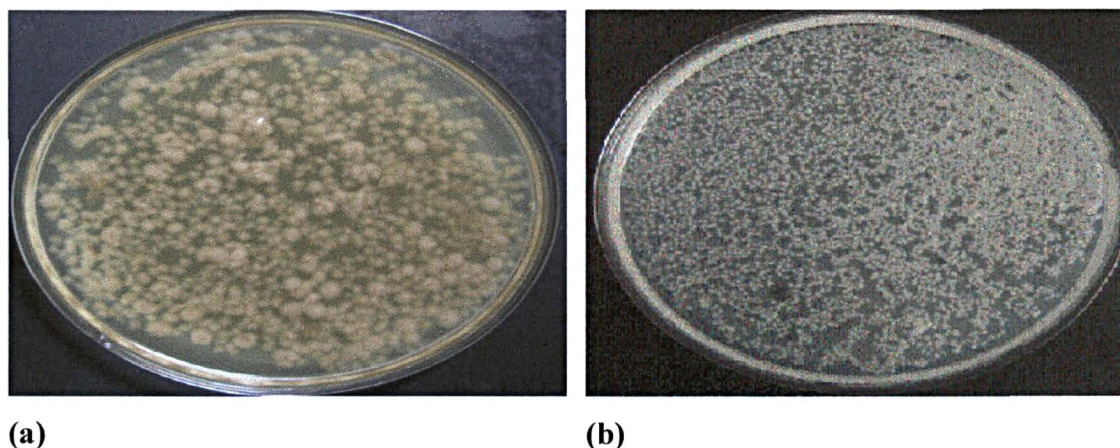
### 5.1. Estudos de Produção de Lipases por *Penicillium corylophilum*

Esta etapa teve por objetivo verificar se era possível a produção da enzima em um meio inorgânico, de custo menor do que o que era normalmente utilizado para produção da enzima em trabalhos anteriores (Fernandes, 2001a). Além disso, a utilização do meio inorgânico poderia beneficiar futuras etapas de purificação, pois não há a formação de pigmentos escuros durante a etapa de esterilização, que normalmente ocorrem com o meio contendo fontes complexas de nitrogênio, como a peptona e o extrato de levedura.

Os resultados mostraram que com o meio de cultivo inorgânico (2) obteve-se atividade máxima de  $7,10 \text{ U.mL}^{-1}$ , após 144 h, a  $29^\circ\text{C}$  e 120 rpm, praticamente o dobro da obtida com o meio complexo (1)  $3,25 \text{ U.mL}^{-1}$ , após 72 h. As produtividades volumétricas calculadas foram as mesmas para ambos os meios ( $0,045 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) (Figura 17). Verificou-se ainda que o meio 1 levou à maior produção de biomassa ( $12,95 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), após 72 h de cultivo, enquanto que, no meio 2, a biomassa produzida foi de  $9,45 \text{ mg.mL}^{-1}$ , após 144 h de cultivo. Calculando-se a atividade específica com relação à biomassa obteve-se  $0,72 \text{ U.mg}^{-1}$  para o meio 2 e  $0,25 \text{ U.mg}^{-1}$  para o meio 1, indicando que biomassa produzida no meio inorgânico (2) é mais produtiva do que a do meio 1, ou seja, o fungo cresceu menos, mas produziu o dobro da atividade volumétrica, o que é uma característica desejável em processos de produção de enzimas. Houve diferenças também na morfologia e biomassa do microrganismo: no meio 1, o fungo produziu *pellets* maiores ( $4,07 \pm 0,10 \text{ mm}$ ) do que os obtidos no meio 2 ( $1,21 \pm 0,05 \text{ mm}$ ) (Figura 18).



**Figura 17.** Produção de lipases por *Penicillium corylophilum*. Condições: Meio 1 (♦), solução de sais, extrato de levedura, peptona de carne e 1 % de óleo de oliva. Meio 2 (■), solução de sais, glucose e 2 % de óleo de oliva. Agitação de 120 rpm e  $29^\circ\text{C}$ .



**Figura 18.** Imagem dos *pellets* produzidos por *Penicillium corylophilum* em meio de cultivo: (a) 1 (fontes orgânicas) e (b) 2 (meio basicamente formado por sais).

Os valores de pH inicial para ambos os meios foram de 6,6 e 7,0 respectivamente e no pico máximo de atividade o pH da fermentação no meio 1 foi de  $6,50 \pm 0,26$  e no meio 2, de  $2,28 \pm 0,05$ .

Apesar da importância do pH do meio de fermentação, poucos são os estudos encontrados em literatura sobre a sua variação durante o cultivo de microrganismos e o efeito na produção de lipases. Segundo Pimentel *et al.* (1997), a maior produção de lipases por *P. citrinum*, usando um meio composto somente de sais, ocorre em pH 2,4. Entretanto, a maioria das publicações revela que a maior produção de lipases ocorre normalmente quando o pH está em torno de 7,0 a 8,0, usando como fonte de nitrogênio extrato de levedura ou peptona (Lima, 2000; Krieger, 1995; Jaeger *et al.*, 1994; Frost e Moss, 1987). Frequentemente observa-se um grande e rápido decréscimo de pH quando se adiciona sais de amônio a meios de cultivo. Segundo Cochrane (1958), Cooke e Whipps (1993) e Miranda *et al.* (1999), a explicação está relacionada ao fato do íon amônio ser um ácido fraco e ao dissociar-se no meio, produz amônia, que entra na célula por difusão passiva, e os íons  $H^+$  são liberados no meio, onde seriam os responsáveis pelo decréscimo do pH. Como a célula se alimenta da amônia, a reação estaria sendo deslocada em função da formação de íons  $H^+$ , que estariam constantemente sendo liberados, assim se observaria uma diminuição gradativa do pH.

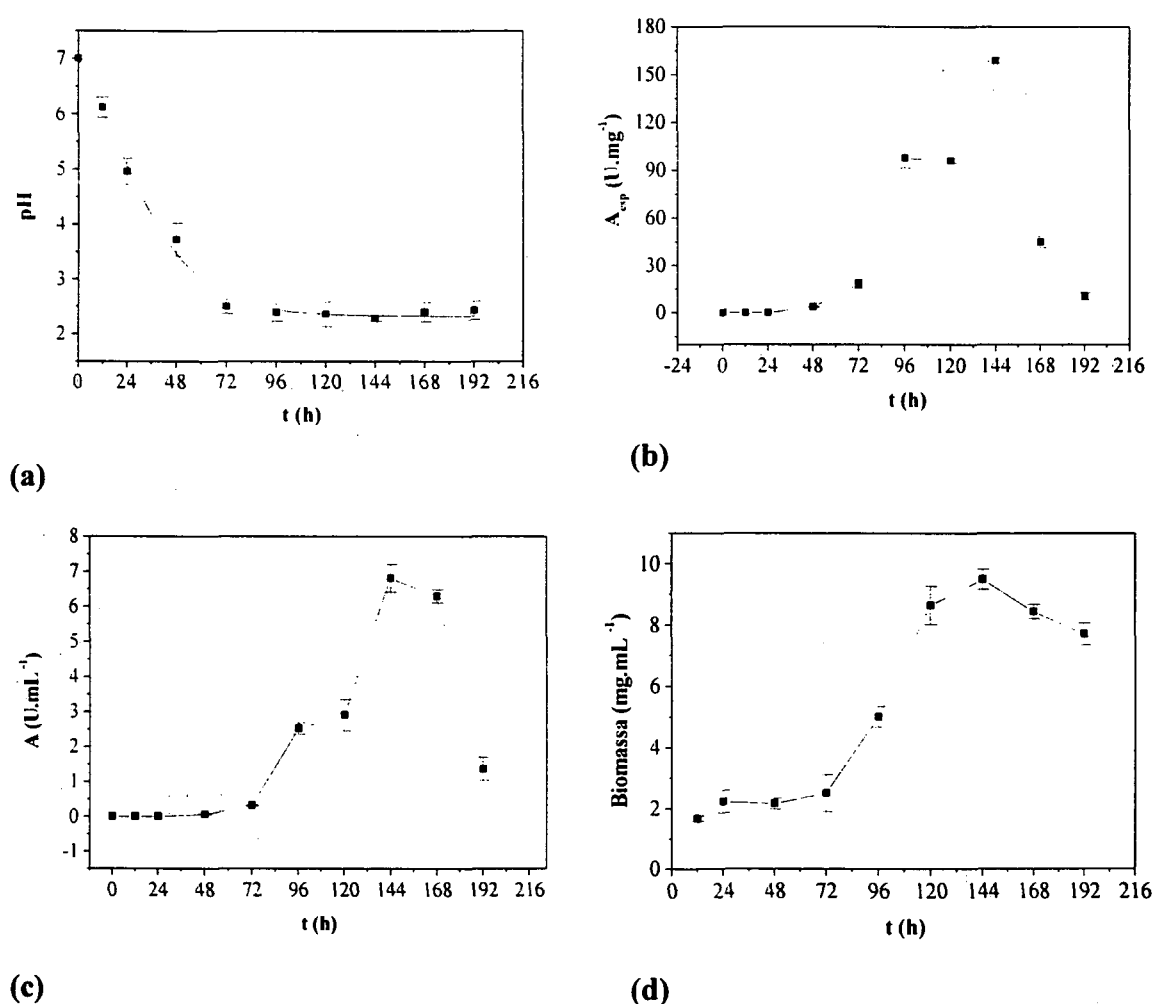
Como a literatura cita que valores de pH entre 7,0 e 8,0 favorecem a síntese de lipases e no cultivo com o meio inorgânico (meio 2) a maior atividade foi obtida quando o pH do meio estava em torno de 2,28, estudou-se a influência do tamponamento do meio de cultivo. O meio foi preparado em tampão fosfato  $7,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  (concentração



semelhante de íons fosfato no meio sem tamponamento), pH 7,0. Observou-se o mesmo decréscimo de pH, concluindo-se que o tamponamento não foi eficiente para manter o pH em torno de 7,0.

Em seguida, estudou-se a cinética de crescimento do microrganismo no meio 2, acompanhando-se o pH, a atividade lipolítica, a concentração de proteínas e a biomassa produzida. Estes experimentos foram feitos no regime de batelada, sacrificando-se três Erlenmeyers para cada tempo estudado.

Os resultados de pH, atividade volumétrica e específica, e biomassa confirmaram os resultados anteriores (Figura 19 a,b,c,d).



**Figura 19.** Cinética de crescimento microbiano durante cultivo para produção de lipase por *Penicillium corylophilum* Dierckx IOC 4211. (a) pH; (b) atividade específica ( $U \cdot mg^{-1}$ ); (c) atividade lipolítica volumétrica ( $U \cdot mL^{-1}$ ); (d) Biomassa ( $mg \cdot mL^{-1}$ ).

Os estudos de crescimento do fungo (Figura 19d) mostraram que a fase lag representa as primeiras 48 h. A fase de crescimento exponencial (log) está entre 72 a

144 h. Calculando-se a taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) obteve-se  $0.02 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ , com um tempo de duplicação de  $37,40 \pm 6,46 \text{ h}$ . A literatura relata que a taxa de crescimento é proporcional à concentração da fonte de nitrogênio. Para *P. citrinum* (Krieger, 1995) observou valores  $\mu$  de  $0.037 \text{ h}^{-1}$  com 0,2 % (m/v) de extrato de levedura e 0,087 com 0,5 % de extrato de levedura. Para *P. restrictum* observou-se  $\mu$  de 0,0495  $\text{h}^{-1}$  (Freire *et al.*, 1997). O tempo de duplicação obtido neste trabalho pode ser considerado relativamente longo, quando comparado com o do *P. citrinum* (Krieger, 1995), 18,73 h com 0,5 % de extrato de levedura e 7,96 h 0,2 % de extrato de levedura, ou seja, o microrganismo cresce mais lentamente num meio onde a concentração da fonte de nitrogênio é relativamente baixa (0,13 %) ou ainda, por se tratar de uma fonte inorgânica.

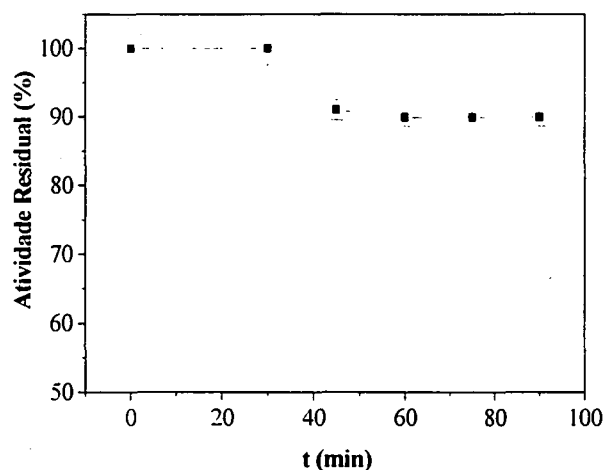
## 5.2. Caracterização do Extrato Lipolítico

### 5.2.1. Estabilidade do Extrato Lipolítico à Liofilização

O processo de liofilização resultou em perda de  $10 \pm 1,27 \%$  num tempo de 90 min, em amostras de 10  $\mu\text{L}$  (Figura 20). Amostras contendo um volume maior (de 4 mL) de extrato lipolítico precipitado, foram liofilizadas num tempo de aproximadamente 24 h e observou-se um resultado muito semelhante e dentro do desvio padrão, ou seja, perda de 9,20 % da atividade lipolítica, que é um valor relativamente baixo. A literatura relata poucos resultados referentes perda de atividade durante a liofilização. Persson *et al.*, (2002b) relataram que lipases de *Candida rugosa* não comerciais, e uma lipase comercial de *P. cepacia* (Amano Pharmaceutical, Nagoya-Japão), tiveram perda de 86,44 % e 79,20 % respectivamente, na atividade específica após a liofilização.

Após a liofilização (Faber, 1997), o conteúdo de água residual está entre 5 a 10 % (m/m), isto porque estará sempre presente uma camada de água ligada aos grupos hidrofílicos presentes nas estruturas das lipases, que normalmente não pode ser removida por liofilização. Para verificar a quantidade de água presente no extrato lipolítico depois da liofilização, a amostra (liofilizada durante 24 h) foi submetida à análise termogravimétrica e a quantidade de água determinada foi de 2,65 % (m/m). Como não houve uma perda acentuada de atividade, e o teor de água residual encontrado na amostra liofilizada foi baixo, sugere-se que a perda de atividade deve estar relacionada a outros fatores. Griebenow e Klibanov (1995, 1997), utilizando a

técnica de FTIR (Infravermelho com transformada de Fourier) demonstraram que a quantidade de  $\alpha$ -hélice da estrutura enzimática diminui após a liofilização, enquanto o conteúdo de  $\beta$ -dobramento aumenta. Em alguns casos as alterações da estrutura secundária são irreversíveis, ocorrendo a desnaturação e a aglomeração das enzimas após a sua re-hidratação (Prestrelski *et al.*, 1993).



**Figura 20.** Influência do tempo de liofilização na atividade enzimática. Condições do ensaio na dosagem da atividade em pNPP: 37 °C, tampão fosfato pH 7,0, 50 mmol.L<sup>-1</sup>.

Alguns autores relatam a adição de substâncias à solução enzimática antes da liofilização, com a finalidade de manter ou aumentar a atividade enzimática (Hasegawa *et al.*, 2003; Persson *et al.*, 2002a). Para verificar esta possibilidade, realizaram-se ensaios com adição de 0,025 % (m/v) de  $\beta$ -ciclodextrina e de cloreto de potássio (1 a 20 % m/v) ao extrato bruto.

#### 5.2.1.1. Liofilização do Extrato Lipolítico com $\beta$ -Ciclodextrina

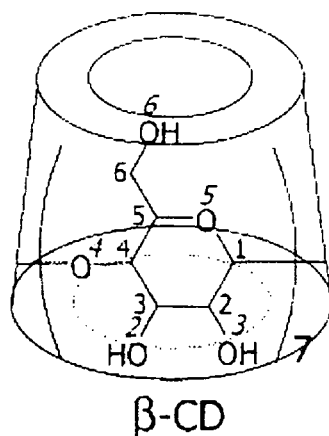
Os resultados mostraram que a liofilização da enzima com  $\beta$ -ciclodextrina resultou em um aumento de 7,3 vezes na atividade enzimática em meio aquoso contra o pNPP (de  $0,34 \pm 0,04$  U.mg<sup>-1</sup> para  $2,50 \pm 0,17$  U.mg<sup>-1</sup>). As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formados por um número variável de unidades de glucose, unidas entre si por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4. As CDs mais conhecidas contém 6, 7 ou 8 unidades de glucose, e são denominadas  $\alpha$ -,  $\beta$ -, ou  $\gamma$ -CD respectivamente. A Figura 21 mostra a estrutura da  $\beta$ -ciclodextrina utilizada neste trabalho.

Hasegawa *et al.* (2003) estudando o efeito da co-liofilização em presença de CDs na atividade da  $\alpha$ -quimotripsina observaram um aumento da atividade enzimática com o

aumento da concentração de ciclodextrina presente no extrato proteolítico liofilizado. Para uma concentração de 1,25 mg de proteína e 25 mg de ciclodextrina (a mesma utilizada neste trabalho), o aumento da atividade foi de 10,30 vezes. A reação realizada foi de transesterificação entre o éster N-benzil-L-tirosina etil (ATEE) e metanol em meio reacional acetonitrila/água (97:3, v/v) a 30 °C durante 24 h.

Ooe *et al.* (1999) estudaram o efeito da liofilização da  $\alpha$ -quimotripsina em presença de CDs e verificaram que a atividade foi 40 vezes maior quando comparada com a enzima livre. Para justificar a ativação observada, propuseram que a formação do complexo enzima-ciclodextrina, que ocorre devido à ligações hidrogênio e interações hidrofílicas entre a enzima e a ciclodextrina, aumentaria a estabilidade da enzima durante a liofilização.

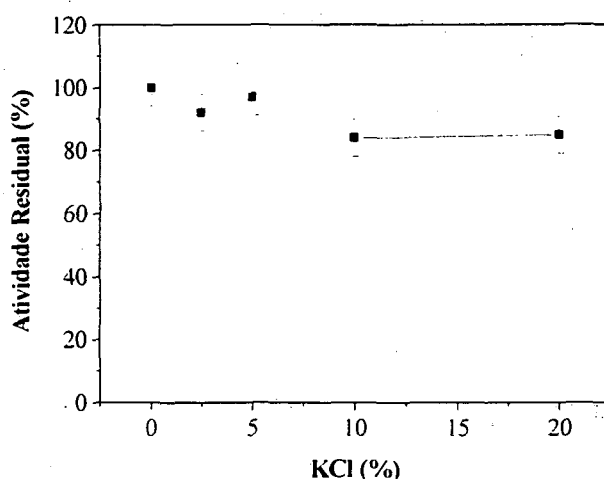
Em ambos os casos (Hasegawa *et al.*, 2003; Ooe *et al.*, 1999) a ativação foi observada em meio orgânico, para reações de síntese, utilizando solventes polares.



**Figura 21.** Estrutura química da  $\beta$ -ciclodextrina. Fonte: Thammarat e Narongsak (2003).

#### 5.2.1.2. Liofilização do Extrato Lipolítico com Cloreto de Potássio

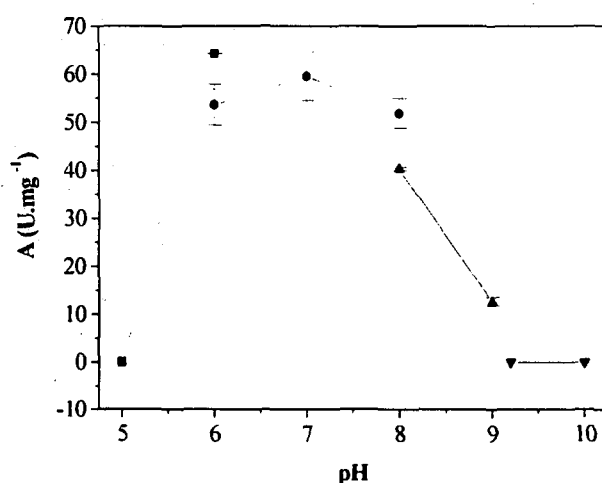
Apesar de alguns autores mencionarem um aumento da atividade enzimática quando enzimas são liofilizadas com cloreto de potássio (Persson *et al.*, 2002b; Ru *et al.*, 1999; Khmelnitsky *et al.*, 1994), os resultados mostraram que o extrato lipolítico perdeu atividade (8 % com 2,5 % de KCl e 15 % com 20 % de KCl) com o aumento da concentração do sal (Figura 22). Uma diferença importante de salientar é que os sistemas reacionais relatados na literatura eram todos orgânicos. A atividade enzimática foi medida, neste trabalho, em sistema aquoso.



**Figura 22.** Atividade do extrato lipolítico liofilizado com diferentes concentrações de KCl. Condições do ensaio na dosagem da atividade em pNPP: meio aquoso, 37 °C, tampão fosfato pH 7,0, 50 mmol.L<sup>-1</sup>.

### 5.2.2. Efeito do pH na Atividade Lipolítica

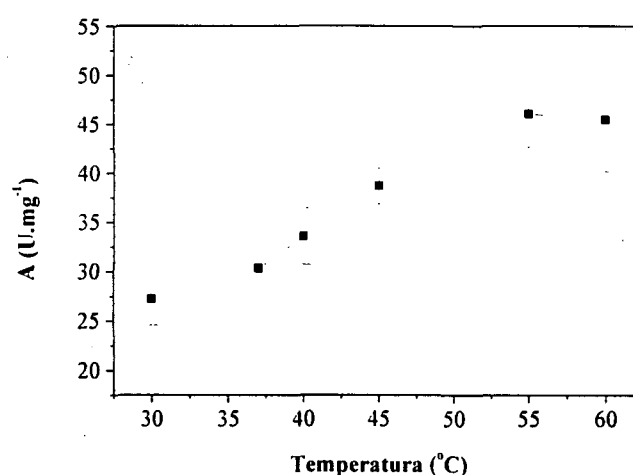
Os resultados referentes à influência do pH na atividade lipolítica (Figura 23), indicaram que existe uma faixa de pH (6,0 e 8,0) onde a atividade enzimática é máxima ( $64,32 \pm 0,09 \text{ U.mg}^{-1}$  a  $59,59 \pm 5,05 \text{ U.mg}^{-1}$ ). Observou-se também que a atividade depende não somente do valor do pH do meio, mas também do tipo de tampão utilizado, como mostra a superposição dos pontos em valores de pH 6,0, (tampão citrato e fosfato) e 8,0 (tampão fosfato e Tris-HCl), na Figura 23. Quando se utilizou tampão Tris-HCl pH 9,0, a atividade foi baixa ( $12,67 \pm 0,89 \text{ U.mg}^{-1}$ ), enquanto que para o tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0 e pH 10,0 não houve atividade enzimática.



**Figura 23.** Efeito do pH na atividade lipolítica do extrato enzimático precipitado. Condições de ensaio: Dosagem pelo método do pNPP, meio aquoso; tampões (■) citrato-fosfato pH 5,0 e 6,0; (●) fosfato pH 6,0, 7,0 e 8,0; (▲) Tris-HCl pH 8,0 e 9,0; (▼) carbonato-bicarbonato pH 9,0 e 10,0, todos 50 mmol.L<sup>-1</sup>; concentração de proteína 0,0097 mg.mL<sup>-1</sup> para o fosfato pH 8,0 e 0,013 mg.mL<sup>-1</sup> para os demais.

### 5.2.3. Efeito da Temperatura na Atividade Lipolítica

Nos resultados referentes à influência da temperatura na atividade lipolítica, observou-se valores crescentes de atividade até 60 °C, como mostra a Figura 24. Entre 45 a 60 °C foram observados os maiores valores de atividade, indicando que a temperatura ótima para a atividade da enzima está nesta região ( $38,70 \pm 1,84$  e  $45,47 \pm 5,36$  U.mg<sup>-1</sup>). Apesar da alta atividade observada ainda a 60 °C, não foram estudadas temperaturas superiores por dificuldades experimentais, tanto devidas ao aquecimento no interior da cela do espectrofotômetro, como na variação dos resultados (ver o desvio padrão obtido para 60 °C, Figura 24).



**Figura 24.** Efeito da temperatura na atividade lipolítica do extrato enzimático. Condições de ensaio: Dosagem pelo método do pNPP, meio aquoso, tempo de reação 1 min. Concentração de proteínas 0,013 mg.mL<sup>-1</sup>.

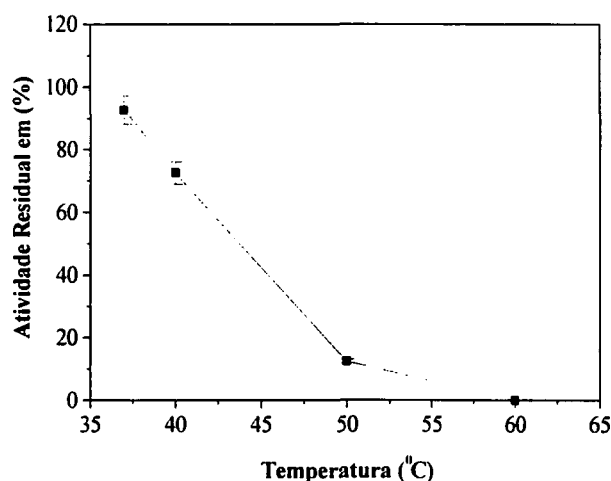
**Tabela 3.** Temperatura ótima para a atividade de algumas lipases de *Penicillium*.

Fungo	Temperatura ótima para a atividade	Referência
<i>P. aurantiogriseum</i>	37-60	Lima <i>et al.</i> , 2003
<i>P. chrysogenum</i>	45	Ferrer <i>et al.</i> , 2000
<i>P. cyclopium</i> (lipase II)	40	Chahinian <i>et al.</i> , 2000
<i>P. restrictum</i>	37 (A e B) e 45 (C)	Gama, 2000
<i>P. wotmanii</i>	45	Costa e Peralta, 1999
<i>P. citrinum</i>	34-37	Krieger, 1995
<i>P. expansum</i>	45	Stoecklein <i>et al.</i> , 1993
<i>P. purpurogenum</i>	45	Venkateshwariu e Reddy, 1993
<i>P. caseicolum</i>	35	Alhir <i>et al.</i> , 1990
<i>P. corylophilum</i>	45 a 60	Este trabalho

Altos valores de atividade lipolítica entre as temperaturas de 37 a 60 °C foram observados para a enzima de *P. aurantiogriseum* (Lima *et al.*, 2003). Entretanto, para a maioria das lipases produzidas por fungos do gênero *Penicillium*, observa-se temperatura ótima para a atividade entre 35 e 45 °C (Gama, 2000; Pimentel *et al.*, 1994, Krieger, 1995), como pode ser observado na Tabela 3.

#### 5.2.4. Estabilidade à Temperatura

O estudo da estabilidade enzimática à temperatura (Figura 25) mostrou um decréscimo de estabilidade com o aumento da temperatura (92,70 % a 37 °C, 44 % a 40 °C, 12,50 % a 50 °C, após incubação por 30 min. A 60 °C, não houve atividade enzimática residual, o que mostra que a enzima produzida por *P. corylophilum* não é termoestável. A literatura relata que lipases fúngicas, de modo geral, são pouco estáveis em temperaturas acima de 40 °C (Razak *et al.*, 1997; Sugihara *et al.*, 1995; Isobe *et al.*, 1988).



**Figura 25.** Estabilidade do extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum* à temperatura. O extrato bruto foi incubado 30 min a 37 °C; 40 °C; 50 °C; 60 °C. Atividade residual medida através da hidrólise do pNPP em meio aquoso.

Os resultados de estabilidade não devem ser comparados com aqueles obtidos para o efeito da temperatura (Figura 24) pois, para os primeiros, a estabilidade foi verificada após um tempo de incubação de 30 min, enquanto que nos ensaios de determinação do efeito da temperatura na atividade, o tempo de reação foi de apenas 1 min. Neste último, a enzima estava ativa mesmo em temperaturas elevadas, tendo em vista a linearidade do aumento da absorvância com o tempo obtido em todas as

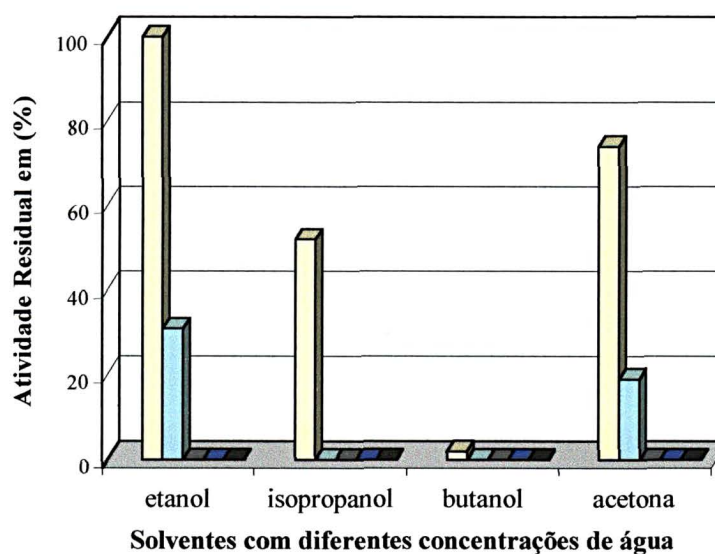
determinações. Outro fator a ser considerado é que a presença do substrato no meio reacional pode proteger a enzima da desnaturação térmica, efeito este encontrado por outros autores (Pimentel *et al.*, 1994). Ensaios futuros de cinética de desnaturação térmica poderão esclarecer estes resultados. Para fins práticos, e devido à baixa estabilidade da enzima à temperatura, escolheu-se 37 °C para todos os ensaios subsequentes. Entretanto, é importante salientar que, em trabalhos futuros esta seria uma variável importante a estudar.

### 5.3. Estudos de Estabilidade em Solventes Polares e Apolares

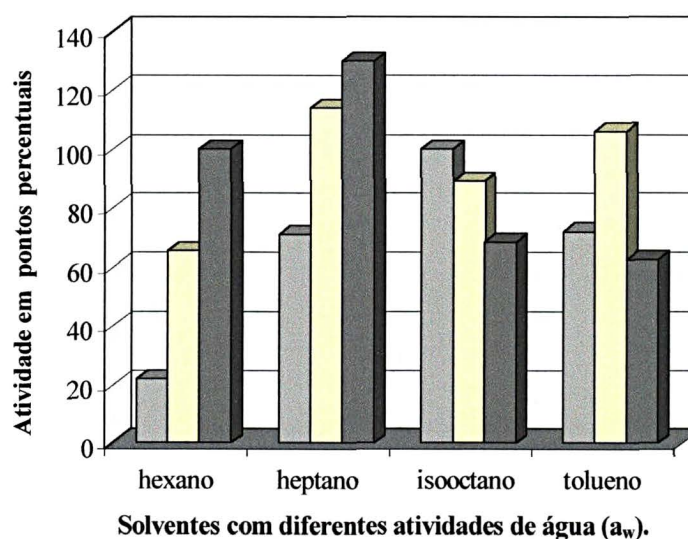
A análise de estabilidade enzimática em solventes polares mostrou que o extrato lipolítico foi estável apenas com baixas concentrações (10 %, v/v) de alguns solventes testados, apresentando atividades residuais de 100 % para o etanol, 74 % para a acetona e 52 % para isopropanol (Figura 26). Com o butanol, a atividade residual foi de apenas 1,70 %. Com concentrações de 20 % (v/v) do solvente, a enzima apresentou atividade somente em etanol (31 %) e acetona (19 %); acima de 20 % (v/v) não foi observada atividade residual nas condições estudadas. Estes resultados mostraram que os solventes polares testados não são apropriados para serem usados como meio reacional nas reações em meios aquo-restritos, com o extrato lipolítico de *P. corylophilum* pois, causam a desnaturação da enzima. A redução da atividade e a inativação da enzima podem ser explicados através de dois mecanismos: primeiramente, pela interação solvente-enzima, que altera a conformação nativa da proteína, pela quebra das ligações de hidrogênio. A outra possibilidade seria pela interação direta com a água essencial em torno da molécula enzimática. Solventes polares são capazes de absorver água e retirar a camada de hidratação da enzima, provocando a perda das propriedades catalíticas por inativação ou desnaturação (Simon *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 1987).

Os resultados da estabilidade do extrato bruto de *P. corylophilum* frente a solventes apolares estão mostrados na Figura 27. Os ensaios foram feitos com controle de atividade de água, sendo estudados os valores de  $a_w$  de 0,11, 0,53 e 0,95. Os melhores resultados foram obtidos para o n-heptano, pois, com os valores mais elevados de  $a_w$ , a enzima mostrou uma ativação de 14 a 30 %. Em seguida, a enzima foi estável no n-hexano (100 % de atividade residual), com  $a_w$  de 0,95. Para estes dois solventes, houve um aumento da atividade residual com o aumento dos valores de  $a_w$ , o que não ocorreu para o isooctano ou para o tolueno.





**Figura 26.** Estabilidade do extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum* em solventes polares. Condições: Porcentagens em solventes 10 % (■); 20 % (■); 30 % (■); 40 % (■); 50 % (■). Tempo de incubação da enzima em presença do solvente: 30 min a 37 °C. Atividade residual medida através da hidrólise do pNPP em meio aquoso.



**Figura 27.** Estabilidade do extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum* em solventes apolares. Atividade de água ( $a_w$ ): 0,11 (■); 0,53 (■); 0,95 (■). Tempo de incubação da enzima em presença do solvente: 30 min a 37°C. Atividade residual medida pelo método do pNPP em meio aquoso.

O efeito dos solventes orgânicos na estabilidade da atividade enzimática geralmente está relacionado com a manutenção da camada de hidratação, necessária para a manutenção da atividade catalítica (Ahmad *et al.*, 1998). Entretanto, outros

fatores podem interferir na atividade da enzima. O efeito de ativação pode ser decorrência de uma interação hidrofóbica entre o solvente e a enzima, com maior exposição do sítio catalítico, o que facilitaria a catálise (Antczak *et al.*, 2002). Um outro fator a ser considerado é que o solvente apolar pode desfazer agregados de enzimas, que normalmente ocorrem por interação hidrofóbica entre as moléculas de proteína (Krieger *et al.*, 1999).

A estabilidade da enzima em solventes orgânicos, se correlacionada com a sua atividade nos meios orgânicos, pode também estar ligada aos valores de log P (logaritmo do coeficiente de partição num sistema bifásico padrão octanol/água) do solvente. Geralmente a atividade enzimática é baixa em solventes que apresentam log P menor do que 2, é moderada em solventes com log P entre 2 e 4, e é alta em solventes apolares com log P maior do que 4. Os valores do log P para os solventes utilizados neste trabalho podem ser observados na Tabela 4 (Ahmad *et al.*, 1998; Jesus *et al.*, 1997; Manjon *et al.*, 1991).

**Tabela 4.** Valores do log P para os solventes empregados no estudo da estabilidade enzimática. Fonte: Lima e Angnes (1999).

<i>Solvente</i>	<i>log P</i>
Etanol	-0,24
Acetona	-0,23
Isopropanol	0,29
Butanol	0,80
Tolueno	2,50
n-Hexano	3,50
n-Heptano	4,00
Isooctano	4,51

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam apenas parcialmente a regra citada acima, pois os maiores valores de atividade residual foram obtidos com o n-heptano e com o tolueno, solventes com log P entre 2,5 e 4,0, indicando que outros fatores relacionados à estrutura do solvente podem estar interferindo na estabilidade da enzima.

Resultados semelhantes foram observados no trabalho de Boakang *et al.* (1994), embora nenhuma explicação tenha sido dada a tal fato. Os autores estudaram a estabilidade de duas lipases comerciais em solventes (log P entre -0,3 a 8,8), através da

síntese do dodecanoato de dodecila e observaram que a maior estabilidade das enzimas foi em presença de n-hexano e n-heptano. Para os solventes com log P acima de 5 (decano e hexadecano) a estabilidade decresceu. É importante ressaltar também que nenhum trabalho sobre o estudo de estabilidade de enzimas em presença de isooctano foi encontrado.

#### 5.4. Comparação da Atividade em Meio Aquoso e Sistema Micelar

A partir dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, as condições experimentais foram definidas para comparar a atividade do extrato em meio aquoso e em meio micelar (solvente n-heptano, temperatura 37 °C, pH 7,0).

Os resultados da hidrólise de ésteres em meio aquoso e em meio micelar estão apresentados na Tabela 5. As maiores atividades enzimáticas foram encontradas para o pNPP em meio aquoso e para a trioleína em meio micelar.

**Tabela 5.** Reações de hidrólise de ésteres com o extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum*. Condições do ensaio: Meio aquoso (1): 37°C, tampão fosfato pH 7,0, 50 mmol.L<sup>-1</sup>, 0,10 % de goma arábica e 0,40 % de Triton X-100. (2) (somente com a Trioleína): 37 °C, 60 % de tampão fosfato pH 7,0, 50 mmol.L<sup>-1</sup>, 20 % de trioleína e 20 % de Triton X-100. Meio micelar 37 °C, tampão fosfato pH 7,0, 50 mmol.L<sup>-1</sup>, (AOT 100 mmol.L<sup>-1</sup>/n-heptano), W<sub>0</sub> 15.

<i>Substrato</i>	<i>Meio Reacional</i>	<i>Tempo de reação (min)</i>	<i>Atividade Específica (U.mg<sup>-1</sup>)</i>
pNPA (C 2)	Aquoso	1	0
pNPB (C 4)	Aquoso	1	123,12 ± 3,05
pNPC (C 6)	Aquoso	1	186,58 ± 10,40
pNPP (C 16)	Aquoso	1	202,85 ± 8,01
pNPP (C 16)	Micelar	15	0,85 ± 0,02
Trioleína (C 18:1)	Aquoso	20	101,69 ± 7,00
Trioleína (C 18:1)	Micelar	30	31,81 ± 0,69

Frente a diferentes ésteres de *p*-nitrofenol (pNP), o extrato de *P. corylophilum* apresentou atividade crescente com o aumento da cadeia acila. Tanto para os substratos sintéticos, como para a trioleína, a atividade foi maior em meio aquoso. Este fato pode ser justificado pela possibilidade de inibição da enzima pelo detergente AOT, que é

frequentemente relatada (Carvalho e Cabral, 2000; Krieger, 1995). Estes resultados não devem ser interpretados em termos de especificidade da lipase presente no extrato bruto, pois a enzima não foi purificada, mas indicam a presença de lipases verdadeiras no extrato bruto concentrado, já que a trioleína é o substrato típico destas enzimas, e o pNPP é o éster de maior comprimento de cadeia entre os ésteres do pNP. Ensaio de purificação da enzima poderão esclarecer estes resultados.

Além disso, o fato de a enzima apresentar atividade no meio micelar mostrou que é válida a utilização deste sistema na exploração de reações de síntese, na comparação com outros sistemas, conforme descrito a seguir.

### 5.5. Esterificação em Sistemas Aquo-Restritos

A partir dos resultados obtidos de estabilidade aos solventes orgânicos (melhor solvente n-heptano), estabilidade térmica (melhor temperatura de 37 °C) e efeito de pH (tampão fosfato, pH 7,0), partiu-se então para uma série de testes de esterificação no sistema de micelas reversas. Observou-se que o extrato lipolítico catalisou a síntese do éster oleato de n-butila, com um rendimento de 80 %, após 9 h de reação e do palmitato de etila, com um rendimento de 24 % após 72 h de reação.

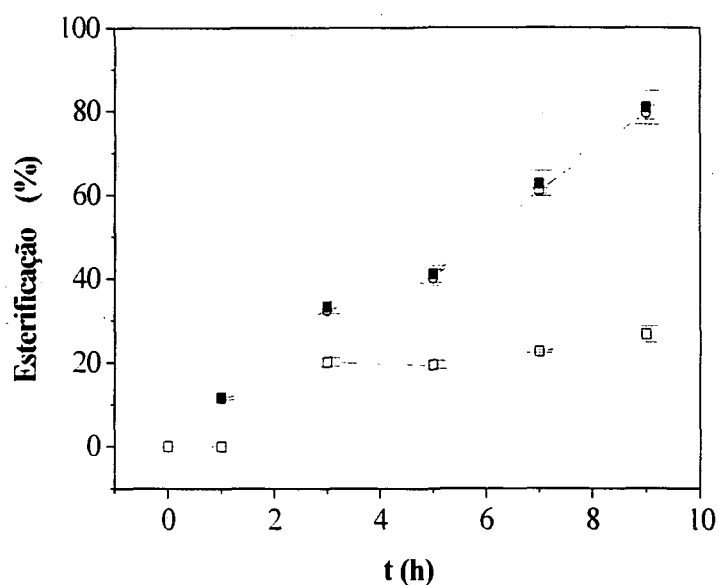
A partir destes resultados, decidiu-se utilizar a síntese do oleato de n-butila como reação modelo nos sistemas aquo-restritos: micro-heterogêneo (micelas reversas), onde estudou-se a variação do  $W_0$  na reação (5, 10 e 15) e, sistemas macro-heterogêneos bifásicos, com controle de  $a_w$  (n-heptano/extrato lipolítico liofilizado, n-heptano/extrato lipolítico liofilizado com  $\beta$ -ciclodextrina e n-heptano/enzima imobilizada em gel de *Octyl Sepharose*).

A escolha pelo oleato de n-butila foi principalmente porque dos ésteres testados, foi o que apresentou maior rendimento e trata-se de um éster de cadeia longa, tipicamente utilizado em reações catalisadas por lipases (Miroslawa *et al.*, 2002; Antczak *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 1996), além de ser um composto de interesse comercial. A literatura descreve que o éster é utilizado para adição no biodiesel durante o inverno, como agente plastificante no cloreto de polivinila (PVC) e em fluidos hidráulicos (Linko *et al.*, 1995 e 1998; Gandhi *et al.*, 1995). As demais condições da síntese foram fixadas, a saber, razão molar álcool/ácido 3 e concentração de proteína no meio reacional igual a 0,38 mg.mL<sup>-1</sup>.

### 5.5.1. Sistema de Micelas Reversas

Para otimizar as condições de síntese, estudou-se a influência do  $W_0$ , com a finalidade de aumentar o rendimento de reação. Experimentos com o  $W_0$  5, 10 e 15 foram realizados em triplicata (Figura 28) e os resultados mostraram que, com o  $W_0$  10, o rendimento foi maior em comparação com o  $W_0$  5, mas apenas no início da reação (1 h) e depois deste tempo, o rendimento e a atividade foram muito semelhantes ( $W_0$  5,  $79,60 \% \pm 1,7$ ;  $11,51 \pm 0,47 \text{ U.mg}^{-1}$  e,  $W_0$  10,  $80,80 \% \pm 4,04$ ;  $11,82 \pm 1,35 \text{ U.mg}^{-1}$ ). O aumento do  $W_0$  para 15 pode favorecer a reação de hidrólise, e consequentemente fez o rendimento diminuir, neste caso consideravelmente: quando comparado com as outras condições, para o  $W_0$  15, o rendimento foi de apenas  $26 \% \pm 1,90$  e a atividade  $4,47 \pm 0,05 \text{ U.mg}^{-1}$  em 9 h de reação. Resultados semelhantes foram observados na síntese no butirato de isobutila (Pinto-Souza *et al.*, 1994), onde utilizou-se como biocatalisador uma cutinase em um sistema de micelas reversas fosfatidilcolina/Isooctano ( $30 \text{ mmol.L}^{-1}$ ). A maior atividade foi obtida em  $W_0$  13 e acima deste valor, a atividade decresceu. Borzeix *et al.* (1992), observaram que na síntese do butirato de n-butila, utilizando  $0,70 \text{ mg.mL}^{-1}$  de uma lipase comercial de *Mucor miehei*, em um sistema micelar AOT/n-hexano a  $40^\circ\text{C}$  e razão molar 1:1, o rendimento foi máximo (70 %) em 30 h,  $W_0$  10 com atividade de  $0,29 \text{ U.mg}^{-1}$ , acima deste  $W_0$  a atividade também decresceu.

A existência de um  $W_0$  ótimo para a velocidade de reação pode estar relacionada a mudanças conformacionais da enzima solubilizada (Martinek *et al.*, 1981), com a cavidade interna da micela, que deve ser compatível com o tamanho da enzima, (Martinek *et al.*, 1989) ou com o tipo de água solubilizada no interior da micela (Krieger *et al.*, 1997b; Melo *et al.*, 1995; Creagh *et al.*, 1993; Prazeres *et al.*, 1992; Castro e Cabral, 1989; Han e Rhee, 1986). Além disso, efeitos difusionais também podem afetar  $W_0$  ótimo para a atividade conforme proposto por Castro e Cabral (1989). Se o substrato é hidrofílico, altos valores de  $W_0$  aumentam a camada de água que circunda a enzima no interior da micela, diminuindo o contato da enzima com o seu substrato e, consequentemente, a atividade catalítica. Presume-se, também que há um aumento da área interfacial com o  $W_0$  (Han e Rhee, 1986), o que significaria uma maior quantidade de substrato disponível para a enzima, com o aumento deste parâmetro, até um máximo, quando os efeitos negativos para a atividade enzimática passariam a sobrepor-se aos positivos.



**Figura 28.** Cinética da reação de síntese do oleato de n-butila, catalisada por extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum* em micelas reversas AOT 100 mmol.L<sup>-1</sup>/n-heptano. W<sub>0</sub> 5 (○); W<sub>0</sub> 10 (■); W<sub>0</sub> 15 (□). Condições: concentração de proteínas 0,38 mg.mL<sup>-1</sup>, 37 °C.

**Tabela 6.** Reações de síntese de ésteres catalisadas por lipases em sistemas de micelas reversas.

Fontes de Lipases	Micelas Reversas	W <sub>0</sub>	Reações	Rendimento e Tempos das reações	Referências
<i>P. corylophilum</i>	AOT/n-heptano	10	Oleico e n-butanol	80 % (9 h)	Este trabalho
<i>T. lanuginosa</i>	AOT/Isooctano	10	Láurico e etanol	90 % (1 h)	Fernandes, 2001b
<i>C. cylindracea</i>	AOT/Isooctano	-	Acético e geraniol	20 % (24 h)	Huang <i>et al.</i> , 1998
<i>R. Delemar</i>	Isooctano/Fosfatidilcolina	4,5	Oleico e n-octanol	90 % (24 h)	Nagayama <i>et al.</i> , 1998
<i>R. Delemar</i>	AOT/Isooctano	7,5	Oleico e n-octanol	90 % (24 h)	Nagayama <i>et al.</i> , 1998
<i>H. lanuginosa (Lipolase)</i>	PC*/n-heptano	14	Decanóico e n-octanol	90 % (24 h)	Svensson <i>et al.</i> , 1996
<i>C. cylindracea</i>	AOT/Isooctano	15	Palmítico com n-butanol, n-octanol e n-dodecanol	95-100 % (120-200 h)	Rao <i>et al.</i> , 1991
<i>C. cylindracea</i>	AOT/Isooctano	8	Láurico e n-butanol	acima de 95 %	Hayes e Gulari, 1990

\*Fosfatidilcolina

Os rendimentos de algumas reações de síntese de ésteres em sistemas de micelas reversas estão apresentados na Tabela 6. Comparando com os resultados obtidos neste

trabalho para a síntese do oleato de n-butila. os resultados podem ser considerados bons com relação ao rendimento, especialmente devido ao fato da enzima não ser comercial e do sistema não estar em equilíbrio, com possibilidade da reação apresentar rendimento de 100 % num tempo próximo de 12 h, conforme está relatado no item 5.5.5.

#### 5.5.2. Sistema Macro-Heterogêneo n-Heptano/Enzima Liofilizada

No sistema n-heptano/enzima liofilizada com controle de  $a_w$  (Figura 29), observou-se rendimento e atividade máximos de  $57,47 \pm 4,02$  % e  $8,97 \pm 2,16$  U.mg<sup>-1</sup>, com  $a_w$  inicial de 0,11. Com o aumento de  $a_w$ , diminuiu levemente o rendimento e a atividade da reação: com  $a_w$  inicial de 0,5 obteve-se  $50,11 \pm 7,50$  % e  $7,48 \pm 0,80$  U.mg<sup>-1</sup>, e com  $a_w$  inicial de 0,95 o rendimento e atividade foram respectivamente de  $42,09 \pm 2,09$  % e  $7,29 \pm 0,66$  U.mg<sup>-1</sup>.

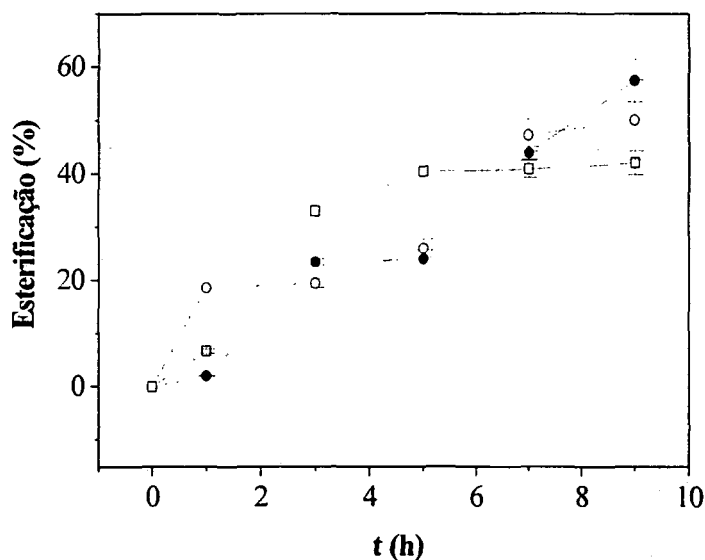
O controle de  $a_w$  inicial, que pode variar durante o curso da reação nos casos em que há produção ou consumo de água, tem sido reportado em inúmeros trabalhos de síntese de ésteres e em resolução de misturas racêmicas.

Chowdary e Prapulla (2002), estudaram a transesterificação entre o n-butanol e o butirato de etila em diferentes  $a_w$ : 0,11, 0,33, 0,54, 0,75 e 0,95 utilizando lipases comerciais e n-hexano como meio reacional, nas condições de 40 °C, 150 rpm e 24 h. Os melhores resultados mostraram que  $a_w$  ótimas foram diferentes para cada lipase, mas em todos os casos, o perfil observado foi o mesmo: uma curva em forma de sino, onde se observou um máximo de rendimento num determinado  $a_w$  e acima ou abaixo deste valor os rendimentos são menores. A esterificação foi máxima com a lipase de *C. rugosa* (92 %) com  $a_w$  de 0,33.

Na síntese do oleato de etila (Tweddell *et al.*, 1998) utilizando a lipase de *R. niveus* em n-hexano, foram estudados  $a_w$  de 0,11, 0,3 e 0,75. A reação se procedeu a 40 °C, razão molar de 1,5 (álcool- ácido) e 10 mg do extrato lipolítico por mL do meio reacional. O maior rendimento (aproximadamente 60 %) foi obtido com  $a_w$  de 0,75 em 192 h de reação.

A partir dos resultados obtidos e da literatura consultada, pode-se concluir que a variação do  $a_w$  pode influenciar não somente no equilíbrio da reação, favorecendo a síntese quando o  $a_w$  é mínimo, mas também na manutenção da estrutura terciária enzimática; neste caso um valor de  $a_w$  pequeno poderia representar um efeito negativo para a atividade enzimática. De fato, a importância deste parâmetro em reações

catalisadas por lipases vai além dos efeitos aqui descritos. Por exemplo, Cheng e Tsai, (2003) verificaram um aumento da enantiosseletividade da lipase de *Candida rugosa*, com a diminuição do  $a_w$ , obtendo-se como melhor resultado a reação com  $a_w$  de 0,11, onde foi observado 90 % de excesso enantiomérico para a reação entre (R,S) 2,2,2-trifluoretil tioéster naproxen e 4-etanol morfolina. Outros autores também relataram efeitos semelhantes (Ducret *et al.*, 1998; Wehtje *et al.*, 1997).



**Figura 29.** Cinética da reação de síntese do oleato de n-butila, catalisada por extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum*. Sistema macro-heterogêneo n-heptano/enzima liofilizada,  $a_w$  0,11 (●);  $a_w$  0,5 (○);  $a_w$  0,95 (□). Condições: concentração de proteínas 0,38 mg.mL<sup>-1</sup>, 37 °C.

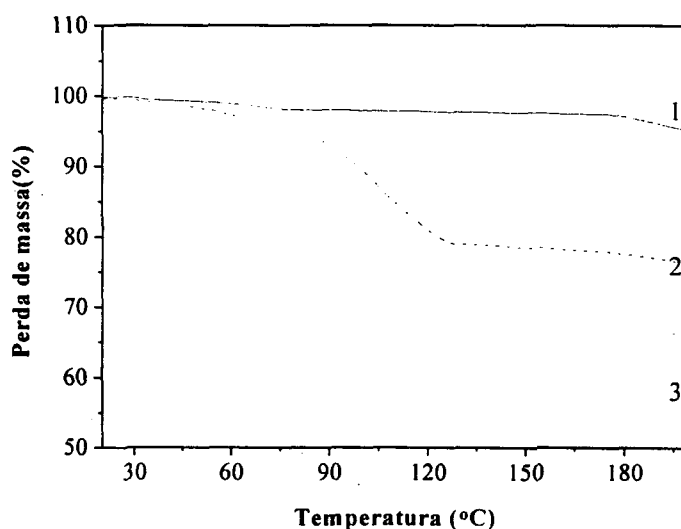
#### 5.5.2.1. Quantificação da Atividade de Água no Extrato Lipolítico

A quantificação da atividade de água no extrato lipolítico teve como objetivo verificar a porcentagem de água adsorvida em diferentes  $a_w$ . O método mais convencional para determinar a  $a_w$  em uma amostra é o de titulometria Karl Fisher (Turner e Vulfson 2000). Particularmente, na determinação do  $a_w$  no biocatalisador (amostra sólida), tem sido utilizada a análise-termogravimétrica (TGA) ou a calorimetria de varredura diferencial (DSC), pois, com estes métodos, resultados semelhantes ao método de Karl Fisher têm sido obtidos (Turner e Vulfson, 2000). Assim, com o objetivo de relacionar-se a massa de água no extrato lipolítico com o  $a_w$ , determinou-se a porcentagem de água (m/m) por TGA e simultaneamente por DTA (análise termogravimétrica diferencial) em amostras liofilizadas e estabilizadas em diferentes  $a_w$ . Os resultados mostraram (Figura 30) que a quantidade de água na amostra correlaciona

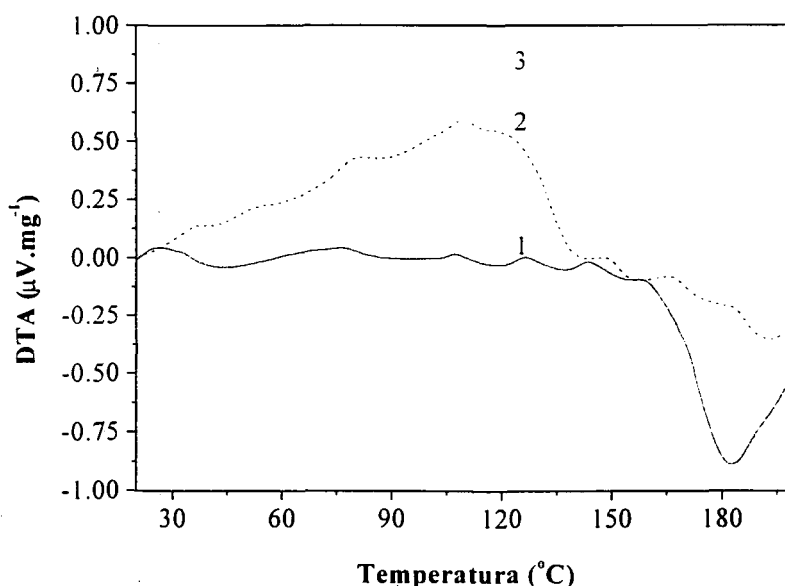


bem com os valores de  $a_w$ : a quantidade de água em porcentagem (m/m) foi de 2,44 % para o  $a_w$  0,11, 21,62 para o  $a_w$  de 0,5 e 38,61 % para o  $a_w$  de 0,95. A temperatura do ensaio variou de 20 °C a 200 °C. Verificou-se a 156 °C (Figura 30), o término da perda de água da amostra (TGA), confirmada pela análise simultânea de DTA (Figura 31), onde se observa o fim de uma reação endotérmica referente à evaporação da água a 156 °C.

A literatura relata poucos dados a respeito da quantificação da  $a_w$  no biocatalisador. Turner e Vulfson (2000) observaram teores de água, com  $a_w$  0,55, de 7,30 %, 7,60 %, 8,30 % (v/v), em lipases de *Candida*, *Mucor* e com a Lysozyme (Novozyme). Estes resultados foram obtidos através de TGA e DSC. Comparando com os resultados deste trabalho, os valores para o mesmo  $a_w$  são muito diferentes (21,62 %, v/v). Era de se esperar que os resultados aqui obtidos estivessem em concordância com os obtidos por Turner e Vulfson (2000). Entretanto, pouco se sabe com relação à dependência da umidade da amostra, os valores de  $a_w$  e o tipo de enzima. A atividade de água é uma propriedade intrínseca da amostra, e nem sempre os teores de umidade correlacionam-se com os  $a_w$  (Fennema, 1993). Além disso, os métodos de equilibrar as amostras e aqueles que determinam o teor de umidade correspondente a um determinado valor de  $a_w$  são diversos e a relação entre estes dois últimos parâmetros nem sempre é fácil de ser determinada, o que pode constituir uma fonte de variação nos resultados.



**Figura 30.** Termograma (TGA) para extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum* em diferentes  $a_w$ : 0,11; 0,5 e 0,95 (1, 2 e 3 respectivamente). A porcentagem de água (m/m) foi calculada a 156 °C. Condições: 40 mg do extrato lipolítico liofilizado, atmosfera de  $O_2$  e gás de arraste  $N_2$ , ambos a 100 mL.min<sup>-1</sup>; aquecimento de 20 a 300 °C e gradiente de temperatura de 10 °C. min<sup>-1</sup>.



**Figura 31.** Termograma (DTA) para extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum* liofilizado em diferentes  $a_w$ : 0,11; 0,5 e 0,95 (1, 2 e 3 respectivamente). A energia, correspondente à reação endotérmica ( $\mu\text{V.mg}^{-1}$ ) foi avaliada em 156 °C. Condições: 40 mg do extrato lipolítico liofilizado, atmosfera de  $\text{O}_2$  e gás de arraste  $\text{N}_2$ , ambos a 100  $\text{mL.min}^{-1}$ ; aquecimento de 20 a 300 °C e gradiente de temperatura de 10 °C.  $\text{min}^{-1}$ .

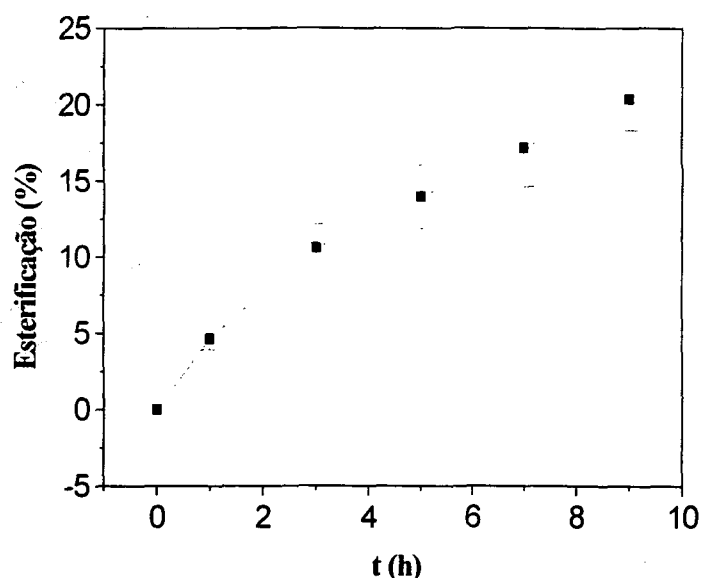
### 5.5.3. Sistema Macro-Heterogêneo *n*-Heptano/Enzima Liofilizada com $\beta$ -Ciclodextrina

Os estudos anteriores (item 5.5.2) mostraram que o maior rendimento na reação de esterificação foi obtida com  $a_w$  de 0,11. Assim, este  $a_w$  foi utilizado no meio reacional contendo o biocatalisador liofilizado em presença de  $\beta$ -ciclodextrina.

O rendimento e a atividade em 9 h de reação foram respectivamente de  $20,37 \pm 3,20$  % e  $3,87 \pm 0,51$   $\text{U.mg}^{-1}$  com  $a_w$  inicial de 0,11 (Figura 32). Estes resultados indicaram que em meio orgânico apolar não houve ativação da enzima co-liofilizada com  $\beta$ -ciclodextrina, à semelhança dos resultados obtidos para as reações em meio aquoso catalisadas pelo mesmo material, quando se obteve uma ativação de aproximadamente 7 vezes (item 5.2.1.1.).

Poucas são as informações descritas em literatura sobre a atividade de enzimas co-liofilizadas com CDs. Hasegawa *et al.* (2003) estudaram reações catalisadas por proteases co-liofilizadas com CDs e verificaram que a natureza do solvente afeta grandemente a atividade da enzima em meios orgânicos. Os autores estudaram solventes com diferentes polaridades (todos polares), mas mesmo assim, não encontraram uma correlação entre o log P, a constante dielétrica e a atividade e sugeriram que a estrutura e a atividade da enzima eram afetadas por interações específicas com os solventes, dependendo da estrutura do solvente. Ao se adicionar em meio orgânico apolar, um

complexo (enzima-ciclodextrina), unido pelas interações hidrofílicas, haverá possivelmente uma mudança conformacional deste complexo, devido à incompatibilidade de hidrofobicidades, formando espécies de “clusters” ou aglomerados, que dificultaria a catálise. Esta mudança conformacional não ocorreria em meio aquoso, nem em meio orgânico polar. Assim, a exposição ao meio orgânico pode estar favorecendo a desnaturação enzimática, pela modificação da estrutura conformacionalmente ativa da enzima.



**Figura 32.** Cinética da reação de síntese do oleato de n-butila, catalisada por extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum*. Sistema macro-heterogêneo n-heptano/enzima liofilizada com  $\beta$ -ciclodextrina,  $a_w$  0,11. Condições: concentração de proteínas  $0,38 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $37^\circ\text{C}$ .

#### **5.5.4. Sistema Macro-Heterogêneo n-Heptano/Enzima Imobilizada**

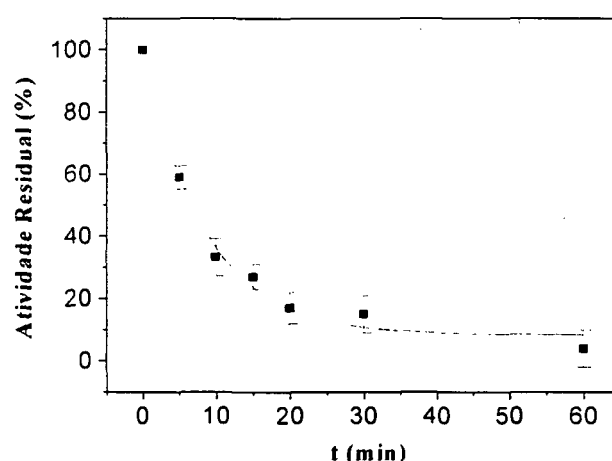
##### **5.5.4.1. Ensaio de Imobilização**

O extrato bruto de *P. corylophilum*, obtido como descrito em 4.9 foi submetido à imobilização no gel hidrofóbico *Octyl Sepharose* (Amersham-Pharmacia Biotech). Estudou-se a cinética, a eficiência e o rendimento da imobilização. Além disso foi verificado também a retenção da atividade após a imobilização como descrito nos itens a seguir (5.5.4.1.1. e 5.5.4.1.2.).

##### **5.5.4.1.1. Cinética de Imobilização**

A cinética de imobilização (Figura 33) mostrou que em 20 min, havia somente  $17 \pm 5,00 \%$  de atividade residual no sobrenadante. Após 1 h, a atividade residual no

sobrenadante era de  $4 \pm 4.00$  %, ou seja  $96 \pm 4.00$  % das proteínas com atividade no pNPP estavam imobilizadas. Os cálculos foram baseados na equação 7 (4.10.3.2). O tempo de imobilização de 1 h aqui obtido pode ser considerado muito bom quando comparado com dados encontrados na literatura: algumas imobilizações requerem 8 h (suporte polipropileno-glicol sepharose), 17 h (gel de glioxil-agarose) e até 48 h (suporte hidrofóbico, Accurel EP 100) de contato entre a lipase e o suporte. (Polomo *et al.*, 2002; Al-Duri e Yong, 2000; Diogo *et al.*, 1999). Altos tempos de imobilização podem favorecer a perda de atividade enzimática, caso a enzima seja pouco estável à temperatura ambiente e à agitação.



**Figura 33.** Cinética de imobilização das lipases de *Penicillium corylophilum* em *Octyl Sepharose*. Atividade residual no sobrenadante determinada pelo método do pNPP, em meio aquoso.

#### 5.5.4.1.2. Parâmetros do Processo de Imobilização: Eficiência e Rendimento

Inicialmente, realizou-se ensaios para estabelecer o limite de saturação do suporte, colocando-se quantidades crescentes de proteína para uma mesma quantidade de suporte. A capacidade de adsorção foi determinada em  $14,52 \pm 0,32$   $\mu$ g de proteínas por mg de suporte. O cálculo dos parâmetros do processo de imobilização (baseados nas equações 7, 8 e 9; item 4.10.3.2.) mostrou que a eficiência da imobilização (E) foi de 100 %, exceto no caso onde havia excesso de proteína no suporte (72 %), o rendimento da imobilização ( $R_1$ ) e a retenção da atividade ( $R_2$ ) considerando o suporte saturado, foi de 96,00 % e 200 %, respectivamente (Tabela 7). Estes resultados mostram que o processo causa pouca desnaturação da enzima, pois o  $R_1$  está muito próximo a 100 % e que houve uma ativação enzimática de 2 vezes ( $R_2$ ).

Estes resultados são importantes, pois mostraram que é possível imobilizar, com uma maior atividade em meio aquoso, as lipases produzidas por *P. corylophilum*. Foram definidas as condições para imobilização em 1 h, com uma razão 14 µg de proteína por mg de suporte. Este material imobilizado foi utilizado nos ensaios de esterificação com o oleato de n-butila, para comparação com os resultados obtidos com a enzima encapsulada em micelas reversas e com a adicionada diretamente no meio reacional.

**Tabela 7.** Parâmetros da Imobilização das lipases de *Penicillium corylophilum* no suporte hidrofóbico *Octyl Sepharose*.

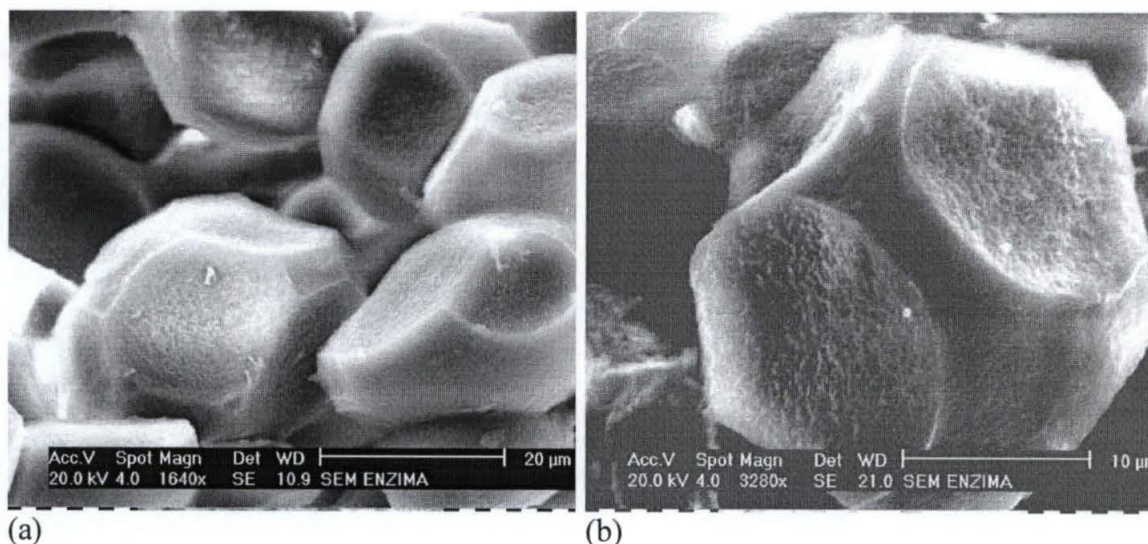
Proteína e atividade adicionada			
<i>P</i> (µg)	5	15	30
<i>At<sub>0</sub></i> (U)	0,37	1,07	2,14
Proteína e atividade no sobrenadante após a imobilização			
<i>P<sub>s</sub></i> (µg)	0	0	8,23 ± 0,30
<i>At<sub>0</sub></i> (U)	0	0	3,05
Proteína imobilizada			
<i>P<sub>imob.</sub></i> (µg)	5,24	15	21,77 ± 0,69
Atividade teórica (calculada) e real após a imobilização			
<i>A<sub>T</sub></i> (U.mg <sup>-1</sup> )	0,25	0,72	1,03
<i>A<sub>R</sub></i> (U.mg <sup>-1</sup> )	0,09 ± 0,01	0,85 ± 0,06	2,06 ± 0,05
Eficiência e rendimento de imobilização			
<i>E</i>	100	100	72 ± 2,30
<i>R<sub>1</sub></i>	24,86 ± 1,74	79,73 ± 5,60	96,44 ± 3,86
<i>R<sub>2</sub></i>	36,80 ± 1,40	120 ± 4,80	200 ± 8,00

P: quantidade de proteína adicionada no suporte (µg); *At<sub>0</sub>*: atividade inicial total (U) do extrato bruto (71,20 U.mg<sup>-1</sup>); *P<sub>s</sub>*: quantidade de proteína no sobrenadante após imobilização (µg); *At<sub>0</sub>*: atividade final total (U) no sobrenadante; *P<sub>imob.</sub>*: proteína imobilizada em 1,5 mg de suporte; *A<sub>T</sub>* e *A<sub>R</sub>*: atividade teórica e real (U.mg<sup>-1</sup>) após a imobilização.

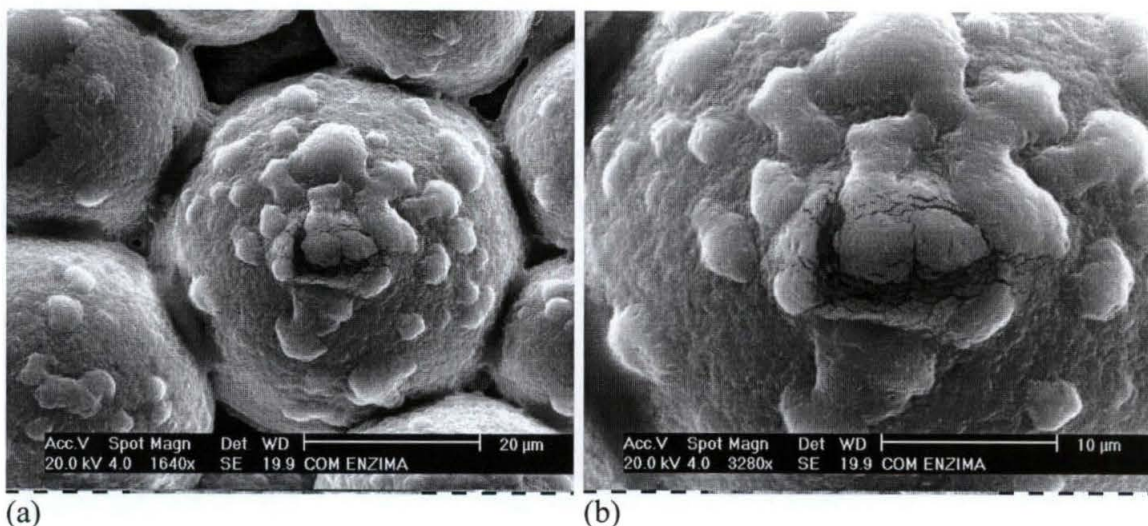
#### 5.5.4.1.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para verificar o efeito da imobilização sobre a estrutura do gel hidrofóbico, as amostras de gel foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura (MEV). As Figuras 34 (a,b) mostram o suporte antes da imobilização e as Figuras 35 (a,b), depois da imobilização. Observa-se que os espaços vazios do gel foram preenchidos, após imobilização, por estruturas arredondadas que seriam as moléculas de proteínas. Reetz e Jaeger (1998), verificaram através da MEV estruturas de um gel hidrofóbico poroso (SIRAN<sup>®</sup>) antes e depois da imobilização, e propuseram um modelo esquemático para

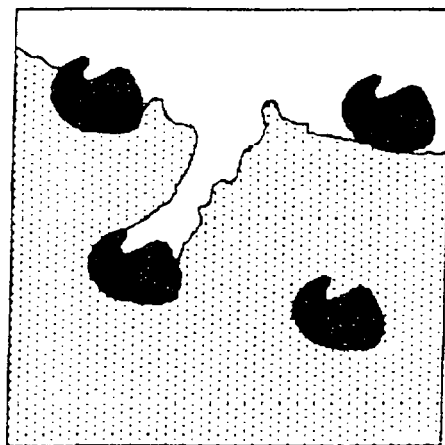
o preenchimento do suporte pelas enzimas (Figura 36), que pode também ser aplicado para explicar a adsorção das lipases de *P. corylophilum* no gel de *Octyl Sepharose*. Estes autores propuseram que em um suporte hidrofóbico poroso a imobilização se processa através de dois fenômenos físico-químicos: a adsorção (superficial) e a partição (inclusão de enzimas no interior dos poros).



**Figura 34.** Fotomicrografia do suporte *Octyl Sepharose* antes da imobilização enzimática. Aumento: a) 1640 b) 3280 vezes.



**Figura 35.** Fotomicrografia do suporte *Octyl Sepharose* após imobilização enzimática. Aumento: a) 1640 b) 3280 vezes.



**Figura 36.** Modelo de adsorção de lipase (figura em preto) sobre géis hidrofóbicos. Fonte: Reetz e Jaeger, 1998.

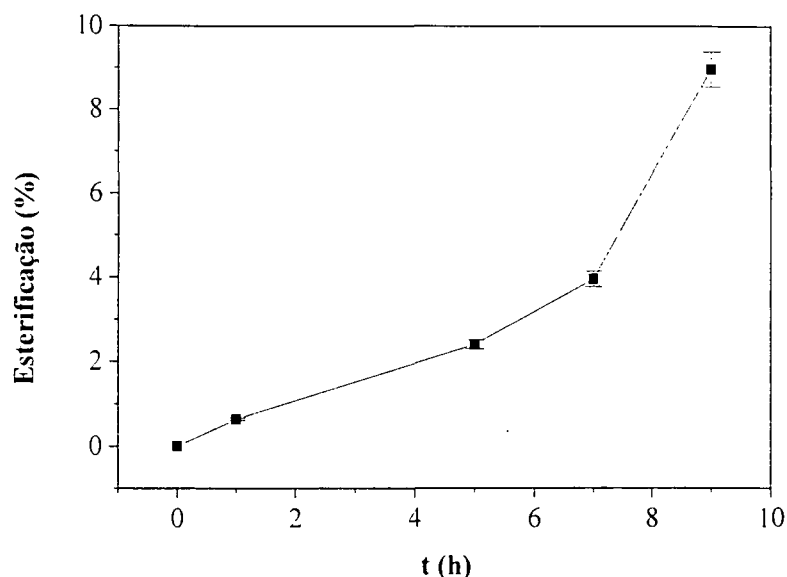
#### 5.5.4.2. Esterificação com a Enzima Imobilizada

Nos experimentos com a enzima imobilizada os reagentes, os solventes e o biocatalisador foram equilibrados com  $a_w$  0,11, devido ao maior rendimento obtido, quando se utilizou este  $a_w$ , no meio contendo a enzima adicionada diretamente no meio reacional. Observou-se rendimento e atividade após 9 h de reação de  $8,96 \% \pm 0,42$  e  $2,74 \pm 0,13 \text{ U.mg}^{-1}$  respectivamente (Figura 37). Comparando estes resultados com os obtidos para os sistemas anteriores (micelas reversas,  $80 \pm 4,04$  n-heptano/enzima liofilizada,  $57,47 \pm 4,02 \%$  e, n-heptano/enzima co-liofilizada com  $\beta$ -ciclodextrina  $20,37 \pm 2,03 \%$ ), o rendimento e a atividade foram muito inferiores.

Observou-se, em lipases de pâncreas de porco, uma perda de 37 % da atividade contra a tributirina (em meio aquoso, 37 °C), após a imobilização por ligação cruzada (Kilinç *et al.*, 2002). Para lipases de *C. rugosa*, na síntese do S- Ibuprofeno em meio contendo 1-propanol (aceptor acil) e isooctano (solvente), a enzima imobilizada apresentou atividade entre 10 a 20 % menor em relação à enzima não imobilizada (Ikeda e Kurokawa, 2002).

Estes resultados mostram, portanto, uma menor atividade da enzima imobilizada na reação de esterificação em meio de solvente orgânico, com relação à enzima livre, no mesmo meio, o que foi diferente dos resultados apresentados para o meio aquoso, onde a enzima após a imobilização mostrou uma ativação. Apesar da ativação enzimática ter ocorrido em meio aquoso, o comportamento do biocatalisador imobilizado em meio aquo-restrito apolar pode não ser o mesmo, pois o suporte pode alterar a geometria ao entrar em contato com um solvente orgânico e consequentemente irá alterar a

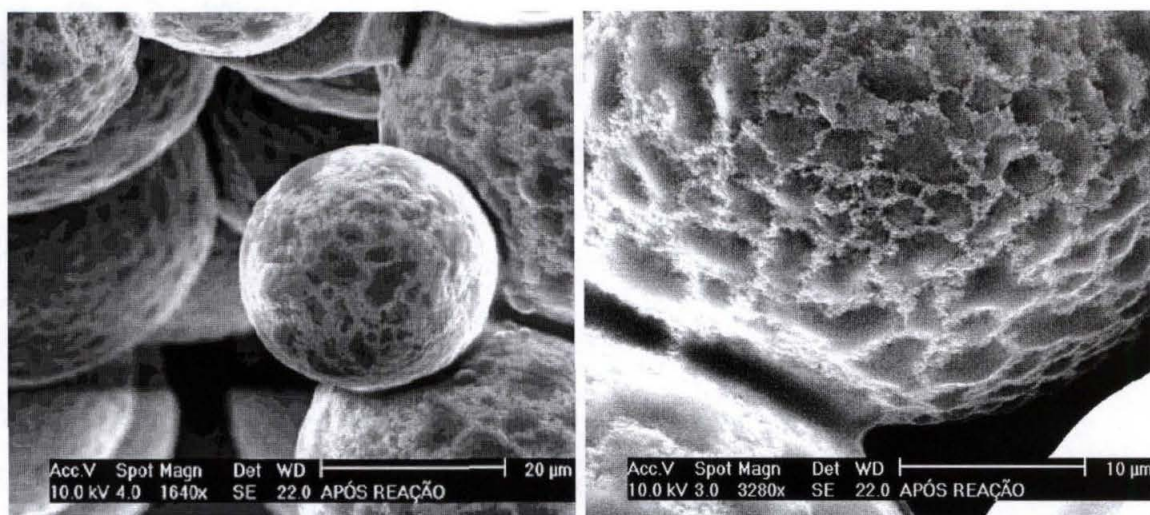
conformação da enzima. Além disso, efeitos conformacionais e estéreis, de partição e difusionais, poderiam ocorrer de maneira diferente nos meios aquoso e orgânico podendo explicar estes resultados.



**Figura 37.** Cinética da reação de síntese do oleato de n-butila, catalisada por extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum*, imobilizado em *Octyl Sepharose*. Sistema macro-heterogêneo n-heptano/enzima imobilizada,  $a_w$  0,11. Condições: concentração de proteínas  $0,38 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $37^\circ\text{C}$ .

Para verificar se ocorriam mudanças na estrutura do suporte durante a reação em meio orgânico, a enzima imobilizada, após 9 h de reação, foi submetida à microscopia eletrônica de varredura (Figura 38 a,b). O que se observa é que realmente houve alterações na superfície do suporte, provavelmente devido à desidratação da camada superficial do material imobilizado pelo n-butanol (substrato), que pode ter levado à uma desnaturação da enzima, o que poderia explicar a baixa atividade obtida com este material em relação aos outros sistemas. Esta desnaturação, para a enzima livre no mesmo meio, ocorreria somente na superfície dos agregados do material sólido, deixando as enzimas ativas situadas no seu interior (Goldberg *et al.*, 1990).





**Figura 38.** Fotomicrografia do suporte *Octyl Sepharose* após reação de esterificação do oleato de n-butila em n-heptano,  $0,38 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $37^\circ\text{C}$ . Aumento: (a) 1640 (b) 3280 vezes.

#### 5.5.5. Comparação dos Sistemas Aquo-Restritos

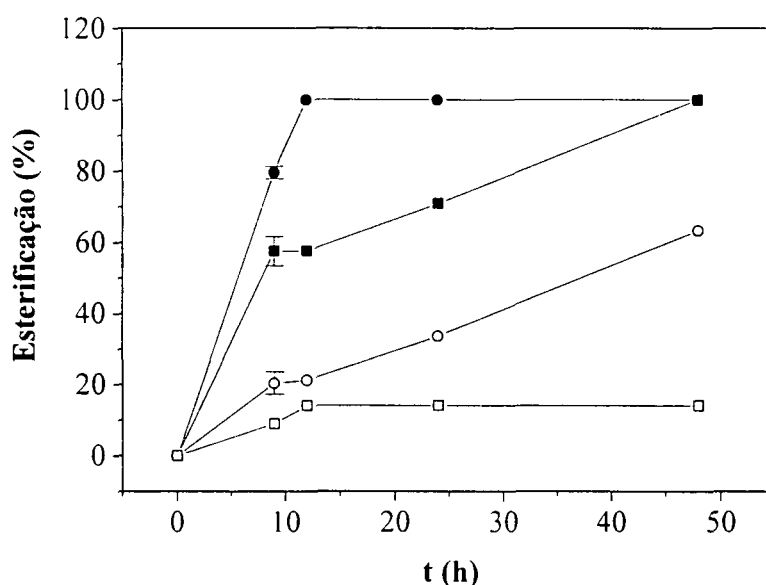
Comparando os sistemas estudados, o maior rendimento para a reação de esterificação entre o ácido oleico e o n-butanol foi alcançado com o sistema micro-heterogêneo de micelas reversas ( $80 \pm 4,04 \%$ ), seguido dos macro-heterogêneos bifásicos n-heptano/enzima liofilizada ( $57,47 \pm 4,02 \%$ ), e n-heptano/enzima liofilizada com  $\beta$ -ciclodextrina ( $20,37 \pm 2,03 \%$ ), para 9 h de reação e mesma concentração de proteínas nos sistemas ( $0,38 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). O sistema de menor rendimento foi o macro-heterogêneo bifásico n-heptano/enzima imobilizada ( $8,96 \pm 0,42 \%$ ). Como nenhuma reação alcançou rendimento de 100 % em 9h, decidiu-se verificar a possibilidade de obter 100 % de rendimento com os sistemas empregados. Para isso, a reação foi seguida por 48 h, utilizando as melhores condições, isto é, meio reacional com AOT/n-heptano para o meio micelar e n-heptano para os demais;  $37^\circ\text{C}$ ; R.M 1:3 (70 de ácido e 210  $\text{mmol.L}^{-1}$  de álcool) e  $W_0$  10 (com tampão fosfato pH 7,0;  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ ) para o sistema de micelas reversas e  $a_w$  0,11 para os demais. Nesta etapa do trabalho, além do método de Lowry-Tinsley para a análise quantitativa do éster formado (Figura 39), utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análises qualitativas dos reagentes e do produto (Figuras 40 e 41).

Os resultados apresentados na Figura 39 mostram que o rendimento foi de 100 % no sistema de micelas reversas (12 h) e no sistema n-heptano/enzima liofilizada (48 h). Para o sistema n-heptano/enzima liofilizada com ciclodextrina, a reação provavelmente

também alcançaria 100 % de rendimento acima de 50 h; entretanto para o sistema n-heptano/enzima imobilizada, a reação entrou em equilíbrio após 12 h, com apenas 14 % de rendimento.

Considerando o desenvolvimento do processo e a produção comercial do produto da esterificação, o sistema de micelas reversas, embora tenha sido o melhor em questões de rendimento e tempo de reação, tem a desvantagem na purificação do produto, quando comparado com os demais sistemas, pois além do solvente e da enzima, há o detergente AOT presente no meio. Para os outros sistemas, somente os solventes e a enzima precisam ser removidos. Portanto, para tornar viável o processo de síntese em sistemas micelares, há que se desenvolver alternativas de purificação do produto que sejam viáveis economicamente.

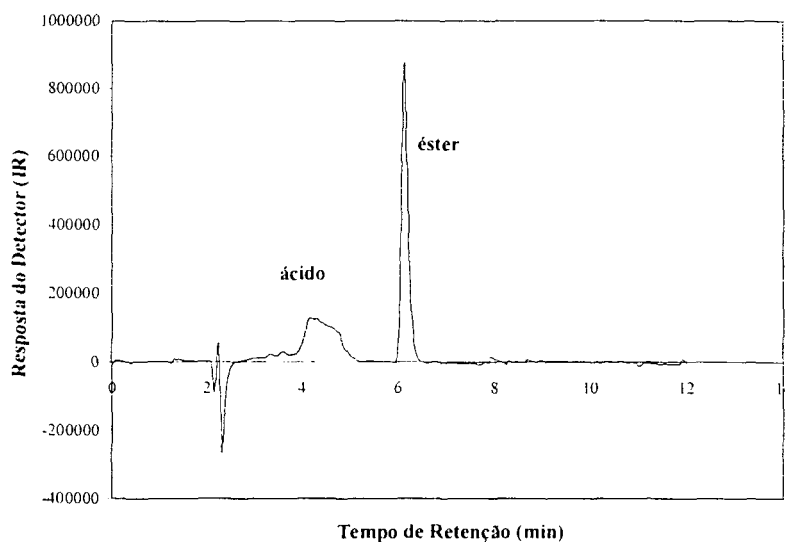
Para o sistema com a enzima imobilizada, não foram realizados ensaios de reutilização do material devido aos baixos rendimentos obtidos.



**Figura 39.** Comparação dos sistemas na cinética da reação de síntese do oleato de n-butila, catalisada por extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum*. Sistema de micelas reversas  $W_0$  10 (●); n-heptano/enzima liofilizada,  $a_w$  0,11 (■); n-heptano/enzima liofilizada com  $\beta$ -ciclodextrina,  $a_w$  0,11 (○) e n-heptano/enzima imobilizada em *Octyl Sepharose*,  $a_w$  0,11 (□). Concentração de proteínas em todos os sistemas foi mantida constante em  $0,38 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

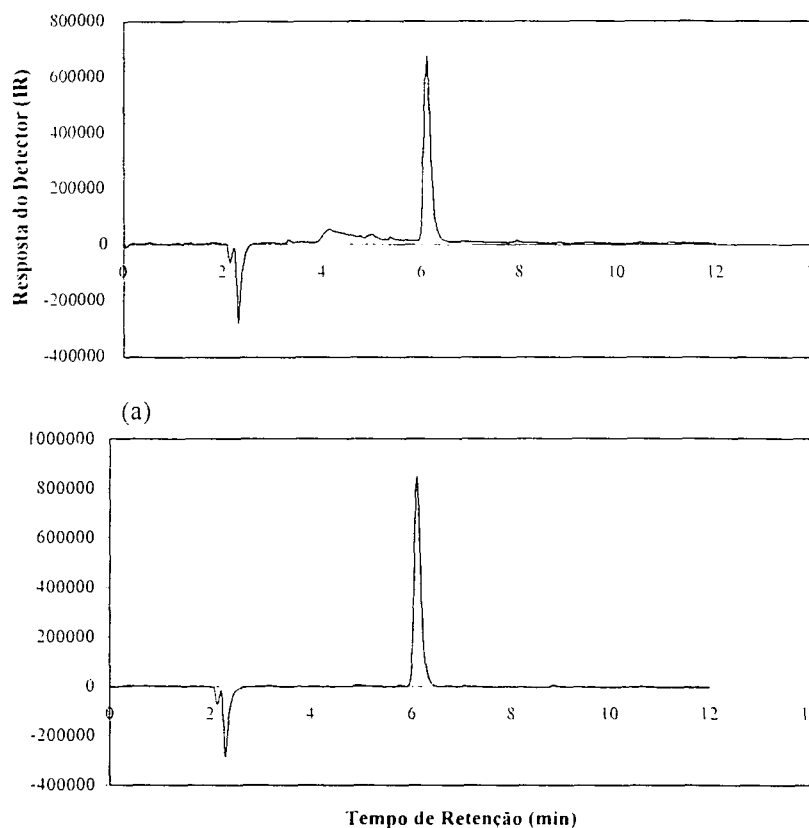
Como os melhores resultados foram obtidos com o sistema de micelas reversas e com n-heptano/enzima liofilizada, as análises por CLAE foram realizadas somente para estes sistemas (Figuras 40 e 41). O objetivo desta análise foi confirmar a presença do éster no meio de reação e, portanto, confirmar os resultados obtidos pelo método de Lowry-Tinsley.

O tempo de retenção do éster foi baseado no tempo de retenção dos reagentes e de um padrão semelhante ao oleato de n-butila (oleato de etila), pois não se conseguiu o éster oleato de butila sintetizado quimicamente com o grau de pureza requerido para o padrão cromatográfico. Os cálculos para a quantificação por CLAE a partir do oleato de etila não deram bons resultados e por isso não estão apresentados.



**Figura 40.** Cromatograma da amostra resultante da esterificação do oleato de n-butila em micelas reversas AOT/n-heptano catalisada pelo extrato lipolítico de *Penicillium corylophilum*. Condições da reação: 12 h, 0,38 mg.mL<sup>-1</sup> de proteínas no meio reacional, W<sub>0</sub> 10, 37 °C. CLAE: fase móvel acetonitrila: acetona (9:1), 0,9 mL.min<sup>-1</sup>, 40 °C e detector de índice de refração, 6 min pico referente ao éster.

O cromatograma do sistema de micelas reversas (Figura 40) revelou uma banda de 4 a 5 min que pode representar vestígios de ácido e AOT e um pico em 6,4 min referente ao éster. No caso de micelas reversas, como não se pode ver a separação entre o AOT e o ácido, não se pode confirmar total conversão em éster, em 12 h, conforme observado pelo método de Lowry-Tinsley, pois há uma sobreposição dos picos do ácido e do AOT, que não foi possível resolver com as condições empregadas.



**Figura 41.** Cromatograma das amostras resultante da esterificação do oleato de n-butila em sistema macro-heterogêneo n-heptano/enzima liofilizada. Condições da reação: 12 h,  $0,38 \text{ mg.mL}^{-1}$  de proteínas no meio reacional,  $a_w$  0,11,  $37^\circ\text{C}$ . CLAE: fase móvel acetonitrila: acetona (9:1),  $0,9 \text{ mL.min}^{-1}$ ,  $40^\circ\text{C}$  e detector de índice de refração, picos em 4 min e 6 min referentes ao ácido e ao éster respectivamente.

No caso do sistema n-heptano/enzima liofilizada, foi possível verificar o decréscimo do pico do ácido e o aumento do pico do éster (de 24 a 48 h de reação), (Figuras 41 a,b). Observou-se, portanto, em 48 h, a total conversão dos substratos em éster, o que confirma os resultados obtidos pelo método de Lowry-Tinsley para esta reação.

#### 5.5.5.1. Discussão dos Resultados Referentes à Comparação dos Diferentes Sistemas Reacionais

O sistema orgânico mais reportado na literatura é o macro-heterogêneo bifásico (sólido-líquido), com teor de água mínimo, normalmente controlado através da atividade de água. Este sistema é formado pela enzima que geralmente está imobilizada e por um solvente apolar (Abbas e Comeau, 2003; Gayot e Coulon., 2003; Rejasse *et al.*, 2003; Gargouri *et al.*, 2002).

A literatura reporta poucos exemplos sobre comparações de meios orgânicos utilizando lipases. Por exemplo, a esterificação do oleato de etila utilizando uma lipase comercial de *R. niger* foi realizada em três sistemas orgânicos (Tabela 8). Dos sistemas utilizados, o melhor foi o bifásico com surfactante, com rendimento de 85 %, obtido em 6 h de reação com 10 % de fase aquosa. O aumento do conteúdo de água para 50 % fez o rendimento da reação diminuir aproximadamente 25 %. No sistema bifásico sem surfactante, o rendimento foi igual ao anterior, mas com o dobro do tempo. Um aumento para 50 % de água no sistema fez o rendimento decrescer pela metade. Para os dois sistemas, o rendimento de reação foi menor com 5 % (v/v) de água quando comparado com as outras proporções de água. Estes resultados sugerem que um conteúdo de água mínimo é requerido para que a enzima atue com maior eficiência. O sistema micro-aquoso foi o menos efetivo; neste caso, o melhor resultado foi de 60 % de rendimento após 192 h de reação, com  $a_w$  de 0,52. Acima deste  $a_w$ , a enzima formou aglomerados que aderiram nas paredes do recipiente de reação, causando flutuações nos resultados, e por isso foram desconsiderados. Tweddell *et al.* (1997), concluíram que os melhores rendimentos obtidos com o sistema bifásico contendo surfactantes se deve ao aumento da área interfacial, neste sistema, favorecendo a catálise pela lipase.

**Tabela 8.** Reações de síntese de ésteres catalisadas por lipases: comparação de sistemas reacionais orgânicos. Sendo: l-l: líquido-líquido; s-l: sólido-líquido.

Fontes de Lipases	Substratos e condições reacionais	Sistemas	Teor de água	Rendimento e Tempos das reações	Referências
<i>R. niger</i>	Oleico Etanol R.M 1:1,5 40 °C; 10 % de enzima (m/v)	bifásico (l-l) n-hexano/ enzima em solução tampão fosfato pH 7,0 0,2 mol.L <sup>-1</sup> com surfactantes (Span 60 e Tween 60)	5 a 50 % (v/v)	85 %, 6 h com 10 % de fase aquosa	Tweddell <i>et al.</i> (1997).
		o bifásico (l-l) n-hexano/ enzima em solução tampão fosfato pH 7,0 0,2 mol.L <sup>-1</sup>	5 a 50 % (v/v)	85 %, 12 h com 10 % de fase aquosa	
		micro-aquoso (s-l), n-hexano e enzima liofilizada	$a_w$ 0,52 a 0,98	60 %, 192 h, $a_w$ 0,52.	

**Tabela 8.** Reações de síntese de ésteres catalisadas por lipases: comparação de sistemas reacionais orgânicos. Sendo: l-l: líquido-líquido; s-l: sólido-líquido (continuação).

Fontes de Lipases	Substratos e condições reacionais	Sistemas	Teor de água	Rendimento e Tempos das reações	Referências
<i>M. miehei</i>	butírico e n-butanol R.M 1:1; 40 °C; 0.7 mg de lipase por mL do meio reacional, 250 rpm	micro-aquoso (s-l) n-hexano/enzima liofilizada, e 0,05 % (m/m) de água no biocatalisador	0.05 % (m/m) de água na enzima	100 % de rendimento em 25 h de reação	Borzeix <i>et al.</i> , 1992
		micelas reversas, AOT/n-hexano, enzima em solução, $W_0$ 10 (5 %, v/v), pH 7,6, 0.1 mol.L <sup>-1</sup>	$W_0$ de 5 a 30	70 %, 30 h, $W_0$ 5	
		bifásico (l-l) n-hexano/água (5 %) e enzima em solução	2,5 a 40 % (v/v)	90 %, 25 h, 5 % água (v/v)	
<i>P. corylophilum</i>	oleico e n-butanol R.M 1:3; 37 °C; 0,38 mg de lipase por mL do meio reacional, 200 rpm	micro-heterogêneo AOT (0,1 mol.L <sup>-1</sup> )/n-heptano/enzima liofilizada	$W_0$ 10	80% de rendimento em 9 h de reação 100 % de rendimento em 12 h	Este trabalho
		Macro-heterogêneo (s-l) n-heptano/enzima liofilizada	$a_w$ de 0,11; 0,53 e 0,95	57 %, 9 h, 100 %, 48 h, $a_w$ 0,11	
		Macro-heterogêneo (s-l) n-heptano/enzima co-liofilizada com $\beta$ -ciclodextrina	$a_w$ de 0,11	20 % em 9 h 63 %, 48 h, $a_w$ 0,11	
		Macro-heterogêneo (s-l) n-heptano/enzima imobilizada em gel hidrofóbico	$a_w$ de 0,11	9 % em 9h 14 %, 48 h, $a_w$ 0,11	

Um outro estudo comparativo de sistemas orgânicos foi através da esterificação do butirato de n-butila. Esta reação foi sintetizada pela lipase comercial de *Mucor miehei* também em três sistemas orgânicos (Tabela 8) (Borzeix *et al.*, 1992). Os melhores resultados foram obtidos com o sistema micro-aquoso, 100 % de rendimento em 25 h de reação.

Considerando os sistemas estudados neste trabalho e a literatura consultada, a comparação entre trabalhos com lipases e condições diferentes deve ser feita com cautela. Entretanto, algumas considerações podem ser feitas: em sistemas micro-heterogêneos como por exemplo o de micelas reversas, o surfactante deve ser

apropriado ou seja não deve inibir a atividade da enzima e, deve-se realizar estudos referentes a recuperação do produto e do biocatalisador (downstream processing); em todos os sistemas macro-heterogêneo, uma quantidade de água mínima é necessária para manter a estrutura catalítica da enzima ativa, também reportada por outros autores (Klibanov, 2001 e Chamouleau *et al.*, 2001); quando o sistema utiliza o biocatalisador imobilizado, pode ser observado um decréscimo da atividade, que pode ser atribuído à problemas de partição, difusionais e alterações conformacionais depois da imobilização, relatados no item 5.5.4.2. Para minimizar estes problemas, o ideal é estudar a performance enzimática em diferentes suportes.

## 6. CONCLUSÕES

---



Os resultados descritos neste trabalho permitiram que fossem apresentadas as seguintes conclusões:

#### I. Ensaaios de Fermentação:

- ❖ Foi possível produzir lipases de *P. corylophilum* em meio de cultivo com fonte inorgânica (meio 2) de nitrogênio, de custo relativamente baixo (cerca 35 vezes menor), com atividades de  $6,81 \pm 0,4 \text{ U.mL}^{-1}$ , após 144 h, a  $29^{\circ}\text{C}$  e 120 rpm de agitação.
- ❖ O fungo cresceu menos no meio inorgânico (biomassa de  $9,45 \text{ mg.mL}^{-1}$ , 144 h de cultivo para o meio 2 e  $12,95 \text{ mg.mL}^{-1}$  após 72 h de cultivo, para o meio 1) entretanto a produtividade foi a mesma ( $0,045 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Calculando-se a atividade específica com relação à biomassa obteve-se  $0,72 \text{ U.mg}^{-1}$  para o meio 2 e  $0,25 \text{ U.mg}^{-1}$  para o meio 1, indicando que biomassa produzida no meio inorgânico (2) é mais produtiva do que a do meio 1 ou seja, o fungo cresceu menos, mas produziu o dobro da atividade volumétrica, o que é uma característica desejável em processos de produção de enzimas. Além disso houve um significativo decréscimo no pH no meio inorgânico (2), que foi de 2,8, contra 6,2 no meio com as fontes complexas de nitrogênio peptona e extrato de levedura (meio 1).

#### II. Características do Extrato Lipolítico Produzido por *Penicillium corylophilum*:

- ❖ Estabilidade do extrato lipolítico à liofilização:

As lipases contidas no extrato bruto perderam  $10 \pm 1,27$  em 90 min. A liofilização foi seguida por 24 h observando um decréscimo semelhante (9,2 %).

A liofilização da enzima com  $\beta$ -ciclodextrina resultou em aumento de aproximadamente 7 vezes na atividade enzimática em meio aquoso contra o pNPP (de  $0,34 \pm 0,04$  para  $2,50 \pm 0,17 \text{ U.mg}^{-1}$ ).

Com a adição de cloreto de potássio no extrato lipolítico observou-se perda de atividade (8 % com 2,5 % de KCl e 15 % com 20 % de KCl) com o aumento da concentração do sal.

- ❖ Efeito do pH e da temperatura: a influência do pH na atividade revelou pH ótimo para a atividade entre 6,0 a 8,0 ( $64,32 \pm 0,09$  a  $59,59 \pm 5,05 \text{ U.mg}^{-1}$ ) e temperatura

ótima entre 45 a 60 °C ( $38.70 \pm 1.84$  e  $45.47 \pm 5.36$  U.mg<sup>-1</sup>). A escolha da temperatura para realização das reações em solventes orgânicos foi baseada na maior estabilidade a 37 °C já que as reações foram seguidas por tempo mínimo de 9 h.

- ❖ Estabilidade à temperatura: as lipases contidas no extrato bruto não são termoestáveis, pois houve um decréscimo de atividade residual com a temperatura (92,70 % a 37 °C, 44 % a 40 °C, 12,50 % a 50 °C). A 60 °C, as enzimas foram totalmente inativadas.
- ❖ Estabilidade em solventes orgânicos: o extrato lipolítico mostrou baixa estabilidade com concentrações altas de solventes polares. Acima de 20 % (v/v) não foi observada atividade residual. Nos estudos com solventes apolares, os melhores resultados foram obtidos para o n-heptano. Com os valores mais elevados de  $a_w$  (0,53 e 0,95), a enzima mostrou uma ativação de 14 e 30 %, respectivamente.
- ❖ Imobilização: a cinética de imobilização mostrou que em 1 h,  $96 \pm 4,00$  % das proteínas encontravam-se imobilizadas; a capacidade de adsorção foi determinada em 14 µg de proteínas por mg de suporte. As melhores condições mostraram: eficiência na imobilização (E) de  $72 \pm 2,30$  %, rendimento de imobilização ( $R_1$ )  $96,44 \pm 3,90$  % e retenção de atividade ( $R_2$ ) de  $200 \pm 8,00$  %. O parâmetro  $R_2$  mostrou que houve ativação enzimática de 2 vezes em relação à atividade do extrato bruto,  $71,20 \pm 1,22$  U.mg<sup>-1</sup> antes da imobilização e  $141,87 \pm 6,70$  U.mg<sup>-1</sup> após a imobilização.

### III. Comparação da Atividade em Meio Aquoso e Sistema Micelar

- ❖ As maiores atividades enzimáticas do extrato bruto de *P. corylophilum* foram encontradas para o pNPP em meio aquoso ( $202,80 \pm 8,01$  U.mg<sup>-1</sup>) e para a trioleína em meio micelar ( $31,81 \pm 0,69$  U.mg<sup>-1</sup>).

#### IV. Esterificação em Sistemas Aquo-Restritos

O melhor sistema para a síntese do oleato de n-butila foi de micelas reversas com 100 % de rendimento em 12 h, com  $W_0$  10 (teor de água). Em seguida, no sistema onde se adicionou a enzima liofilizada, o rendimento foi de 100 % em 48 h com  $a_w$  inicial de 0,11. Para o sistema onde a enzima foi co-liofilizada com  $\beta$ -ciclodextrina, o rendimento foi de 63 % em 48 h de reação com  $a_w$  inicial de 0,11.

O sistema menos eficiente foi o que utilizou a enzima imobilizada em gel hidrofóbico, com rendimento de 14 % em 48 h de reação e  $a_w$  inicial de 0,11.

É importante ressaltar que, o extrato lipolítico empregado nestes ensaios não é comercial e que as variáveis do sistema não foram completamente estudadas; logo, os resultados obtidos neste trabalho podem ser considerados bons, porque abrem uma perspectiva de estudo da otimização, visando uma diminuição do tempo de reação ou ainda a utilização desta enzima em reações cujos produtos são de alto valor agregado.

## **7. ETAPAS FUTURAS**

---

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram esclarecer algumas questões sobre a biocatálise em diferentes sistemas orgânicos empregando lipases de *Penicillium corylophilum*. Entretanto, algumas ainda permaneceram por esclarecer e servirão de ponto de partida para a continuação deste projeto, conforme se segue:

I. Investigação de questões relativas à purificação da enzima:

- ❖ Realizar ensaios de purificação, com a finalidade de caracterizar a(s) lipase(s) responsável(eis) pela catálise nas reações de esterificação.

II. Investigação de questões relativas à cinética enzimática

- ❖ Estudar a cinética de desativação da(s) lipase(s) através de ensaios da estabilidade em diferentes tempos e temperaturas.

III. Investigação de questões relativas à biocatálise

- ❖ Realizar experimentos variando a concentração de  $\beta$ -ciclodextrina no extrato lipolítico verificando o resultado através da síntese do oleato de n-butila em meio orgânico apolar e polar;
- ❖ Realizar ensaios da síntese do oleato de n-butila com as enzimas imobilizadas em outros tipos de suportes;
- ❖ Aplicação do sistemas micelas reversas e n-heptano/enzima liofilizada em reações com substratos racêmicos ou com produção de compostos de alto valor agregado.
- ❖ Estudar a recuperação dos produtos de reação (downstream processing) do sistema micelar.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 5, p. 589-595, 2003.

ADLERCREUTZV, P. Enzyme catalyzed lipid modification. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 12, p. 231-254, 1994.

AHMAD, R.M.Y.; WILLIAM, A.A.; MURRAY, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7/8, p. 438-450, 1998.

AIRES-BARROS, M.R. **Extração Líquido-Líquido de Produtos Biológicos: Recuperação de Produtos de Fermentação (Ácidos Carboxílicos) e Proteínas**. Lisboa 1990. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Setor de Tecnologia, Universidade Técnica de Lisboa.

AL-DURI, B.; YONG, Y.P. Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 3, p. 207-215, 2000.

ALHIR, S.; MARKAKIS, P.; CHANDAN, R.C. Lipase of *Penicillium caseicolum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 398-601, 1990.

ALAM, M.Z.; FAKHRU'L-RAZI, A. Enhanced settleability and dewaterability of fungal treated domestic wastewater sludge by liquid state bioconversion process. **Water Research**, v. 37, n. 5, p. 1118-1124, 2003.

ALAM, M.Z.; FAKHRU'L-RAZI, A.; AZNI, I.; SURAINI, A. Bioconversion of domestic wastewater sludge by immobilized mixed culture of *Penicillium corylophilum* WWZA1003 and *Aspergillus niger* SCahmA103. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 307-318, 2002.

ANTCZAK, T.; GRACZYK, J.; ANTCZAK, M.; BIELECKI, A. Activation of *Mucor circinelloides* lipase in organic medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19/20, n. 2, p. 287-294, 2002.

ANTCZAK, T.; HILER, D.; KRYSTYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; GALAS, E. Mathematical modelling of ester synthesis by lipase in biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4/6, p. 1043-1050, 2001.

ARROYO, M.; SINISTERRA, JV. Influence of chiral corvones on selectivity of pure lipase-B from *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 525-530, 1995.

BALCÃO, V.M.; PAIVA, A.L. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392-416, 1996.

BANDMANN, N.; COLLET, E.; LEIJEN, J.; UHLÉN, M.; VEIDE, A.; NYGREN, P.A. Genetic engineering of the *Fusarium solani* pisi lipase cutinase for enhanced partitioning in PEG-phosphate aqueous two-phase systems. **Journal of Biotechnology**, v. 79, n. 2, p. 161-172, 2000.

BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISÁN, M. J. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486-493, 1998.

BÉLAFI-BAKÓ, K.; DOMBI, A.; SZABÓ, L.; NAGY, D.G.E. Effect of temperature on hydrolysis of triolein by lipase. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 94, n. 3, p. 291-297, 1994.

BELIANINA, V.F.; CHAGIN, B.A.; ROMANOVA, T.N.; KOCKENOVA, M.M.; VANDYSHEVA, T.N.; YUDAEV, A.P. Study on conditions of mass exchange in biosynthesis of penicillin in industrial fermentors with aerodynamic foam suppression. **Antibiotiki**, v. 29, n. 2, p. 86-90, 1984.

BERTO, P.; BELINGHERI, L.; DEHORTER, B. Production and purification of a novel extracellular lipase from *Alternaria brassicicola*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 6, p. 533-536, 1997.

BORNSCHEUER, T.U.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; KRISHNA, H.S. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 433-437, 2002.

BORZEIX, F.; MONOT, F.; VANDECASTEELE, J.P. Strategies for enzymatic esterification in organic solvents: Comparison of microaqueous, biphasic, and micellar systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 10, p. 791-797, 1992.

BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A.M.; DEREWENDA, Z.S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J.P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; THIM, L.; MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 34, p. 767-770, 1990.

BRZOZOWSKI, A.M.; DEREWENDA, U.; DEREWENDA, Z.S.; DODSON, G.G.; LAWSON, D.M.; TURKENBURG, J.P.; BJOKLING, F.; HUGE-JENSEN, B.; PATKAR, S.A.; THIM, L. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**, v. 351, p. 491-494, 1991.

CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. Reversed Micelles in Liquid-Liquid Extraction. In: Kennedy, J.F. and Cabral, J.M.S. (Eds.). **Recovery Processes for Biologocal Materials**. U.K.: John Wiley & Sons, 1993. p. 247-271.

CARVALHO, C.M.L.; CABRAL, J.M.S. Reverse micelles as reaction media for lipases. **Biochimie**, v. 82, n. 11, p. 1063-1085, 2000.



CARVALHO, C.M.L.; AIRES-BARROS M.R.; CABRAL J.M.S. Cutinase: From Molecular Level to Bioprocess Development. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 66, n. 1, p. 17-34, 1999.

CASTRO, M.J.M.; CABRAL, J.M.S. Stability of hydrogenase in AOT reversed micelles. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, n. 10, p. 668-672, 1989.

CASTRO, M.J.M.; CABRAL, J.M.S. Reversed micelles in biotechnological processes. **Biotechnology Advances**, v. 6, p. n. 2, p. 151-167, 1988.

CASTILLO, F.P.; NAVARRO, A.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Lipase-catalyzed synthesis of xylitol monoesters: solvent engineering approach. **Journal of Biotechnology**, v. 102, n. 3, p. 251-259, 2003.

CHAHINIAN, H.; VANOT, G.; IBRICK, A.; RUGANI, N.; SARDA, L.; COMEAU, L.C. Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium* purification and characterization of partial acylglycerol lipase. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, n. 2, p. 215-222, 2000.

CHAMOULEAU, F.; COULON, D.; GIRARDIN, M.; GHOUL, M. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 949-954, 2001.

CHANG, P.S.; RHEE, J.S. Characteristics of *Chromobacterium viscosum* lipase-catalysed glycerolysis of triglycerides in AOT-isooctane reversed micelles. **Biocatalysis**, v. 4, p. 253-335, 1990.

CHEN, J.P.; LIN, W.S. Sol-gel powders and supported sol-gel polymers for immobilization of lipase in ester synthesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 7, p. 801-811, 2003.

CHENG, Y.C.; TSAI, S.W. Effects of water activity and alcohol concentration on the kinetic resolution of lipase-catalyzed acyl transfer in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 3/4, p. 362-368, 2003.

CHOWDARY, G. V.; PRAPULLA, S. G. The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 393-397, 2002.

CHUANYI, Y.; SHAOKUN T.; JINHONG, Z.; YAOTING Y. Kinetics of lipase deactivation in AOT/isooctane reversed micelles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 18, n. 4-6, p. 279-284, 2002.

COCHRANE, V. W. **Physiology of fungi**. New York, John Wiley & Sons, 1958.

COOKE, R.C.; WHIPPS, J.M. **Ecophysiology of Fungi**. Oxford: Blackwell Scientific, 1993. p. 23-96.

CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; ISMAILI, A.M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, n. 1-4, p. 75-78, 1998.

CORZO, G.; REVAH, S. Production and characterization of lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 2, p. 173-180, 1999.

COSTA, M.A.; PERALTA, R.M. Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*). **Journal of Basic Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 11-15, 1999.

CREAGH, A.L.; PRAUSNITZ, J.M.; BLANCH, H.W. Structural and catalytic properties of enzyme in reverse micelles. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 5, p. 383-392, 1993.

CROOKS, G.E.; REES, G.D.; ROBINSON, B.H.; SVENSSON, M.; STEPHENSON, G.R. Comparison of Hydrolysis and Esterification behaviour of *Humicola lanuginosa* and *Rhizomucor miehei* lipases in AOT-stabilized water-in-oil microemulsions: I. Effect of pH and water content on reaction kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 48, p. 78-88, 1995.

CYGLER, M.; SCHRAG, J.D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods Enzymology**, v. 284, parte A., p. 3-27, 1997.

DAVIS, N. D.; WAGENER, E.; DALBY, D. K.; MORGAN-JONES, G.; DIENER, U.L. Toxigenic fungi in food. **Applied Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 159-161, 1975.

DHARMSTHITI, S.; LUCHAI, S. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 241-246, 1999.

DI GIAMBATTISTA, R.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M.; FENICE, M. The chitinolytic activity of *Penicillium janthinellum* P 9: purification, partial characterization and potential applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 498-505, 2001.

DIOGO, M.M.; SILVA, S.; CABRAL, J.M.S.; QUEIROZ, J.A. Hydrophobic interaction chromatography of *Chromobacterium viscosum* lipase on polypropylene glycol immobilised on Sepharose. **Journal of Chromatography A**, v. 849, n. 2, p. 413-419, 1999.

DUCRET, A.; TRANI, M.; LORTIE, R. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 4, p. 212-216, 1998.

ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 9, p. 325-329, 2001.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**, 4. ed.; Springer-Verlag, Berlin, 1997.

FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. 2. ed.; Acribia, S.A., 65-70, 1993.

FERNANDES, A.M. **Produção e purificação de novas enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos**. Curitiba: UFPR. 2001a. 29 p. Relatório de Iniciação Científica.

FERNANDES, M.L.M **Hidrólise de triglicerídeos e síntese de éster de ácido graxo em sistemas de micelas reversas**. Curitiba, 2001b. 107 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica)- Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

FERNANDES, P.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. **Biocatálise aplicada em biotecnologia: fundamentos e aplicações**, LIDEL: eds N-Lima e M.Mota, Edições técnicas, 2001.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J.M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1/2, p. 185-197, 1998.

FERRER, M.; PLOU, F.J.; NUERO, O.M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A. Purification and properties of a lipase from *Penicillium crysogenum* isolated from industrial wasters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 75, n. 7, p. 569-576, 2000.

FIEDURECK, J. Enhancement of beta galactosidase production and secretion by osmotic stress in *Penicillium notatum*. **Microbiological Research**, v. 153, n. 1, p. 65-69, 1998.

FREIRE, D.M.; TELE, E.M.F.; BOM, E.P.S.; SANT'ANNA JUNIOR., G. L. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a Bench-scale fermenter. Effect of a carbon and nitrogen nutrition, agitation and aeration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63-65, p. 409-421, 1997.

FROST, G.M.; MOSS, D.A. Production of enzymes by fermentation. **Enzyme Technology**, v. 7, p. 112-121, 1987.

FUJIKAWA, H.; IBE, A.; WAUKE, T.; MOROZUMI, S.; MORI, H. Flavor production from edible oils and their constituents by *Penicillium corylophilum*. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v. 43, n. 3, p. 160-164, 2002.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.

GAMA, M.F.C.P.J.S. **Purificação e caracterização de lipases de *Penicillium restrictum***. Rio de Janeiro, 2000, 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

GANDHI, N.N.; SAWANT, S.B.; JOSHI, J.B. Specificity of a lipase in ester synthesis: effect of alcohol. **Biotechnology Progress**, v. 11, p. 282-287, 1995.

GAO, Y.; BREUIL, C. Extracellular lipase production by a sapwood-staining fungus *Ophiostoma piceae*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, 11, 42, 638-642, 1995.

GARCIA-MORENO, E.; RUIZ, M.A.; BARBAS, C.; PINGARRÓM, J.M. Determination of organic peroxides in reversed micelles with a poly-N-methylpyrrole horseradish peroxidase amperometric biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 448, n. 1/2, 9-17, 2001.

GARCIA, T.; SANCHEZ, N.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Enzymatic synthesis of fatty esters; Part I. kinetic approach. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 7, p. 584-590, 1999.

GARGOURI, M.; DROUET, P.; LEGOY, M.D. Synthesis of a novel macrolactone by lipase-catalyzed intra-esterification of hydroxy-fatty acid in organic media. **Journal of Biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 259-266, 2002.

GAYOT, X.S.; COULON, D. Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content. **Journal of Biotechnology**, v. 101, n. 1, p. 29-36, 2003.

GERRITSE, G.; HOMMES, R.W.; QUAZ, W.J. Development of a lipase fermentation process that uses a recombinant *Pseudomonas alcaligenes* strain. **Journal of Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n. 51, p. 2644-2651, 1998.

GOLDBERG, M.; THOMAS, D.; LEGOY, M.D. Water activity as a key parameter of synthesis reactions: The example of lipase in biphasic (liquid/solid) media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, n. 12, p. 976-981, 1990.

GOMBERT, A.L.P.; CASTILHO L.R.; FREIRE, D.M.G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 1/2, p. 85-90, 1999.

GONÇALVES, A.P.V. **Imobilização de uma cutinase recombinada no zeólito NaY: estudos cinéticos e de estabilidade**. Lisboa, 1999, 246 f. Tese (Doutorado em biotecnologia) Setor de Ciências Exatas. Universidade Técnica de Lisboa.

GOTO, A.; YOSHIOKA, H.; MANABE, M.; GOTO, R. NMR, spectroscopic study on the dissolution of water in sodium bis (2-ethylhexyl)sulfosuccinate/toluene solution. **Langmuir**, v. 11, p. 4873-4875, 1995.

GOTOR, V. Lipases and (R)-oxynitrilases: useful tools in organic synthesis. **Journal of Biotechnology**, v. 96, n. 1, p. 35-42, 2002.

GRABLEY, S.; GRANZER, E.; HÜTTER, K.; LUDWIG, D.; MAYER, M.; THIERICKE, R.; TILL, G.; WINK, J.; PHILIPPS, S.; ZEECK, A. Secondary metabolites by chemical screening. 8. Decarestrictines, a new family of inhibitors of

cholesterol biosynthesis from *Penicillium*. 1. Strain description, fermentation, isolation and properties. **The Journal of Antibiotics**, v. 45, n. 1, p. 56-65, 1992.

GRIEBENOW, K.; KLIBANOV, A.M. Can conformational changes be responsible effects on the catalytic behavior of subtilisin carlsberg in organic solvents? **Biotechnology and Bioengineering**, v. 53, p. 351-362, 1997.

GRIEBENOW, K.; KLIBANOV, A.M. Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 10969-10976, 1995.

HALLING, P.J. Organic liquids and biocatalysts: theory and practice. **Trends in Biotechnology**, v. 7, p. 50-52, 1989.

HAN, D.; RHEE, J.S. Characteristics of lipase-catalysed hydrolysis of olive oil in AOT-Isooctane reverse micelles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p. 1250-1256, 1986.

HAYES D.G.; GULARI, E. Ethylene glycol and fatty acid have a profound impact on the behavior of water-in-oil microemulsions formed by the surfactant Aerosol-OT. **Langmuir**, v. 11, p. 4695-4702, 1995.

HAYES, D.G.; GULARI, E. Esterification reactions of lipase in reverse micelles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p. 793-801, 1990.

HASEGAWA, M.; YAMAMOTO, S.; KOBAYASHI, M.; KISE, H. Catalysis of protease/cyclodextrin complexes in organic solvents: Effects of reaction conditions and cyclodextrin structure on catalytic activity of proteases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 3-4, p. 356-361, 2003.

HAZARIKA, S.; GOSWAMI, P.; DUTTA, N.N.; HAZARIKA, A.K. Ethyl oleate synthesis by Porcine pancreatic lipase in organic solvents. **Chemical Engineering Journal**, v. 85, n. 1, p. 61-68, 2002.

HIOL, A.; JONZO, M.D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L.C. Purification and characterization of an extracellular lipase from thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 5-6, p. 421-430, 2000.

HUANG, S.Y.; CHANG, H.L.; GOTO, M. Preparation of Surfactant-Coated Lipase for the Esterification of Geraniol and Acetic Acid in Organic Solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 7, p. 552-557, 1998.

IBRIK, A.; CHAHINIAN, H.; RUGANI, N.; SARDA, L.; COMEAU, L.C. Biochemical and structural characterization of triacylglycerol lipase from *Penicillium cyclopium*. **Lipids**, v. 33, n. 4, p.377-384, 1998.

IKEDA, Y.; KUROKAWA, Y. Enantioselective esterification of racemic ibuprofen in isooctane by immobilized lipase on cellulose acetate-titanium iso-propoxide gel fiber. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 1, p. 98-100, 2002.

ISOBE, K.; AKIBA, T.; YAMAGUCHI, S. Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium cyclopium*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, p. 41-47, 1988.

IVANOV, E.A.; SCHNEIDER, P.M. Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. **Jornal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 3, n. 6, p. 303-309, 1997.

IZUMI, T.; NAKAMURA, K.; FUKASE, T. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp KW1-56. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 1253-1258, 1990.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K.E.; RANSACK, S.; KOCH, H.B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B.W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, 29-63, 1994.

JANSSEN, P.H.; MONK, C.R.; MORGAN, H.W. A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp., and continuous assay of its *p*-nitrophenyl-palmitate esterase activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 120, p. 195-200, 1994.

JENSEN, R.G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. **Lipids**, v. 18, p. 650-657, 1983.

JESUS, P.C.; JUAREZ J.; SILVA, P.L.F.; BURLIN, G.; NASCIMENTO, M.G. Organo-Gel: Um Sistema para a Imobilização de Lipases e sua Aplicação em Síntese Orgânica. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 664-672, 1997.

JONATHAN, S.D. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, n. 4, p. 194-211, 1989.

JONES, A.; WOOD, D.N.; RAZNIEWSKA, T.; GAUCHER, G.M.E; BEHIE, L.A. Continuous production of penicilin G by *P. chrysogenum* cells imobilized on celite biocatalyst particles. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 64, n. 4, p. 547-552, 1986.

KAMINI, N.R.; MALA, J.G.S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 5, p. 505-511, 1998.

KAMYSHNY, A.; TROFIMOVA, D.; MAGDASSI, S.; LEVASHOV, A. Native and modified glucose oxidase in reversed micelles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 24, n. 3/4, p. 177-183, 2002.

KAZLAUSKAS, R.J.; BORNSCHEUER, U.T. Biotransformations with lipases. In: Rehm, H.J., Pihler, G., Stadler, A. e Kelly, P.J.W. **Biotechnology**, n. 8, p. 37-192, 1998.

KHMELNITSKY, Y.; WELCH, S.; CLARK, D.; DORDICK, J.S. Salts dramatically enhance activity of enzymes suspended in organic solvents. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 6, p. 2647-2648, 1994.

KHMELNITSKY, Y.L.; LEVASHOV, A.V.; KLYACHKO, N.L.; MARTINEK, K. Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 12, p. 710-724, 1988.

KILINÇ, A.; ÖNAL, S.; TELEFONCU, A. Chemical attachment of porcine pancreatic lipase to crosslinked poly(vinyl alcohol) by means of adipoyldichloride. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 641-647, 2002.

KIRAN, K.R.; DIVAKAR, S. Lipase catalyzed synthesis of organic acid esters of lactic acid in non-aqueous media. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 109-121, 2001.

KLIBANOV, A.M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**, v. 409, p. 241-246, 2001.

KNEZEVIC, Z.; BOBIC, S.; MILUTINOVIC, A.; OBRADOVIC, B.; MOJOVIC, L.; BUGARSKI, B. Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 313-318, 2002.

KRIEGER, N.; TAIPA, M.A.; MELO, E.H.M.; LIMA-FILHO, J.L.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. Purification of the lipase from *Penicillium citrinum* by chromatographic process. **Bioprocess Engineering**, v. 20, p. 59-65, 1999.

KRIEGER, N.; TAIPA, M.; AIRES-BARROS, M.R.; MELO, E.H.M.; LIMA-FILHO, J.L.; CABRAL, J.M.S. Purification of *Penicillium citrinum* lipase using AOT-Isooctane reversed micelles. **Jornal Chemical Biotechnology**, v. 69, p. 77-85, 1997a.

KRIEGER, N.; TAIPA, M.A.; FONTANA, J.D.; MELO, E.H.M.; LIMA-FILHO, J.L.; CABRAL, J.M.S. Kinetics characteristics of *Penicillium citrinum* lipase in AOT/isooctane reversed micelles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 67, n. 1-2, p. 85-87, 1997b.

KRIEGER, N. **Produção, Purificação e Caracterização de Lipases de *Penicillium citrinum***. Curitiba, 1995. 260 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

KRISHNA, S. H.; MANOHAR, B.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S.G.; KARANTH, N.G. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 191-201, 2001.

KVITTINGEN, L. Some aspects of biocatalysis in organic solvents. **Tetrahedron**, v. 50, n. 28, p. 8253-8274, 1994.

LEE, D.; KOK, Y.; KIM, K.; KIM, B.; CHOI, H.; KIM, D.; SUHARTONO, M.T.; PYUN, Y. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 393-400, 1999.

LIMA, A.W.O.; ANGNES L. Biocatálise em Meios Aquo-Restritos: Fundamentos a Aplicações em Química Analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 229-245, 1999.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; SARQUIZ, M.I.M.; MITCHELL, D.A.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J.D. Effect of Nitrogen and Carbon Sources on Lipase Production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technology Biotechnology**, 41, 2, 105-110, 2003.

LIMA, V.M.G. **Lipases de *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx IOC 4212**. Curitiba, 2000. 157 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LIN, S.F.; CHIOU, C.M.; TSAI, Y.C. Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 62, p. 959-962, 1995.

LINKO, Y.Y.; LÄMSÄ M.; WU X.; UOSUKAINEN E.; SEPPÄLÄ J.; LINKO P.; Biodegradable products by lipase biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 41-50, 1998.

LINKO, Y.Y.; LÄMSÄ, M.; HUHTALA, A.; RANTANEN, O. Lipase Biocatalysis in the Production of Esters. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 72, n. 11, p. 1293-1299, 1995.

LIU, G.; LU, S.; JIANG, Y.; WU, Y. Production and characteristics of thermostable lipolytic enzymes from *Monascus fuliginosus*. **Ewishengwu-Xuebao**, v. 35, n. 2, p. 109-114, 1995.

LOUWRIER, A.; DRTINA, G.J.; KLIBANOV, A.M. On the issue of interfacial activation of lipase in nonaqueous media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, p. 1-5, 1996.

LOWRY, R.R.; TINSLEY, J.I. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.

LUISI, P.L.; GIOMANI, M.; PILENI, M.P.; ROBINSON, B.H. Reverse micelles as hosts of proteins and small molecules. **Biochimica et Biophysica Acta**, 947, 209-246, 1988.

LUISI, P.L.; MAGID, L.J. Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon micellar solutions. **Critical Reviews in Biochemistry**, n. 20, p. 409-474, 1986.



MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, n. 38, v. 5, p. 715-721, 2002.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, n. 24, v. 1, p. 87-93, 2001.

MANJON, A.; IBORRA, J.L.; AROCAS, A. Short chain flavor ester synthesis by immobilized lipase in organic media. **Biotechnology Letters**, v. 13, p. 339-344, 1991.

MANNHOLD, R.; REKKER R.F. The hydrophobic fragmental constant approach for calculating log P in octanol/water and aliphatic hydrocarbon/water systems. **Perspectives in Drug Discovery and Design**, v. 18, p. 1-18, 2000.

MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. **Chemosphere**, v. 40, n. 4, p. 339-346, 2000.

MARÍN, M.; PEDREGOSA, A.; RÍOS, S.; ORTIZ, M.L.; LABORDA, F. Biodegradation of Diesel and Heating Oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5: its Possible Applications on Bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 35, n. 1/3, p. 269-285, 1995.

MARTINEK, K.; KLYACHKO, N.L.; KABANOV, A.V.; KHMELNITSKI, Y.L.; LEVASHOV, A.V. Micellar enzymology: its relation to membranology. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 981, p. 161-172, 1989.

MARTINEK, K.; LEVASHOV, A.V.; KLYACHKO, N.L.; KHMELNITSKY, Y.L.; BEREZIN, I.V. Micellar enzymology (review). **Europe Journal Biochemistry**, n. 155, p. 453-468, 1986.

MARTINEK, K.; LEVASHOV, A.V.; KLYACHKO, N.L.; PANTIN, V.I.; BEREZIN, I. The principles of enzyme stabilization: VI catalysis by water-soluble enzymes entrapped into reversed micelles of surfactantes in organic solvents. **Biochimica et Biophysica Acta**, 657, 277-294, 1981.

MECHAKRA, A.; AUBERGER, B.; REMEUF, F.; LENOIR, J. Optization of a culture medium for acid proteolytic enzyme production by *Penicillium camembertii*. **Science des Aliments**, v. 19, n. 6, p. 663-675, 1999.

MEDEIROS, R.G., HANADA, R. E FERREIRA E.X.F. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species. **International Biodeterioration & Biodegradation**, In Press, Corrected Proof, Available online 15 April 2003.

MELO, E.P.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. Triglycerides hydrolysis and stability of a recombinant cutinase from *Fusarium solani* in AOT-isooctane reversed micelles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 50, p. 45-56, 1995.

MIKAILOVA, R.V.; LOBANOK, A.G.; SHISHKO, Z.F.; YASENKO, M.I. Effects of conditions of *Penicillium funiculosum* G-15 cultivation on production of extracelular

glucose oxidase. **Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya**, v. 36, n. 2, p. 199-203, 2000.

MIRANDA, O.A.; SALGUEIRO, A.A.; PIMENTEL, M.C.B.; LIMA-FILHO, J.L.; MELO, E.H.M.; DURÁN, N. Lipase production by a brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. **Bioresource Technology**, v. 69, p. 145-147, 1999.

MIROSLAWA, S.A.; TADEUSZ, A.; MALGORZATA, R.; STANISLAW, B. Catalytic properties of membrane-bound *Mucor* lipase immobilized in a hydrophilic carrier. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19, n. 20, p. 261-268, 2002.

MUKHERJEE, K.D. Lipase-catalyzed reactions for modification of fats and other lipids. **Biocatalysis**, n. 3, p. 277-293, 1990.

NAGAO, T.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Expression of Lipase cDNA from *Fusarium heterosporum* by *Saccharomyces cerevisiae*: High-Level Production and Purification. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, n. 6, p. 488-492, 1996.

NAGAYAMA, K.; MATSU-URA, S.; DOI, T.; IMAI, M. Kinetic characterization of esterification catalyzed by *Rhizopus delemar* lipase in lecithin-AOT microemulsion systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 4, n. 1/2, p. 25-32, 1998.

OHNISHI, K.; YOSHIDA, Y.; SEKIGUCHI, J. Lipase production of *Aspergillus oryza*. **Journal of Fermentation Bioengineering**, v. 77, n. 5, p. 490-495, 1994.

OISHI, H.; MORIMOTO, T.; WATANABE, Y. Purification and characterization of phospholipase B from *Kluyveromyces lactis* and cloning of phospholipase B gene. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 83-90, 1999.

OLIVEIRA, A.C.; ROSA, M.F.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. Enzymatic esterification of ethanol and oleic acid - a kinetic study. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 999-1005, 2001.

OOE, Y.; YAMAMOTO, S.; KOBAYASHI, M.; KISE, H. Increase of catalytic activity of  $\alpha$ -chymotrypsin in organic solvents by co-lyophilization with cyclodextrins. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 385-389, 1999.

ORLICH, B.; SCHOMÄCKER, R. *Candida Rugosa* lipase reactions in nonionic w/o-microemulsion with a technical surfactant. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 1, p. 42-48, 2001.

PAIVA, A.L.; BALCÃO, V.M.; MALCATA, F.X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 3/5, p. 187-204, 2000.

PALMA, M.B.; PINTO, A.L.; GOMBERT, A.K.; SEITZ, K.H.; KIVATINITZ, S.C.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 1137-1145, 2000.

PALOMO, J.M.; MUÑOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, C.M.R.; GUISÁN, J.M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, n. 2, p. 279-286, 2002.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; THOMAZ-SOCCOL, V. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 29, p. 119-131, 1999.

PAPAPARASKEVAS, D.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J. Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. **Biotechnology Letters**, v. 14, p. 397-402, 1992.

PATEL, M.T.; NAGARAJAN, R.; KILARA, A. Lipase-catalyzed biochemical reactions in novel media: a review. **Chemical Engineering Communications**, v. 153, p. 365-404, 1996.

PATEL, R.N.; HOWELL, J.M.; MCNAMEE, C.G.; FORTEY, K.F.; SZARKA, L.J. Stereoselective enzymatic hydrolysis of alpha-((acetylthio)methyl) benzenepropanoic acid and 3-acetylthio- 2-methylpropanoic acid. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 16, p. 34-47, 1992.

PENCREACH, G.; BARATTI, J. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p.417-422, 1996.

PERSSON, M.; COSTES, D.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 7, p. 916-923, 2002a.

PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 833-841, 2002b.

PETERSEN, S.B.; JHONSON, P.I.; FOJAN, P.; PETERSEN, E.I.; PETERSEN, M.T.N.; HANSEN, S.; ISHAK, R.J.; HOUGH, E. Protein engineering the surface of enzymes. **Journal of Biotechnology**, n. 66, p. 11-26, 1998.

PIMENTEL, M.C.B.; MELO, E.H.M.; LIMA-FILHO, J.L.; LEDINGHAM W.M.; DURÁN, N. Lipase from a Brazilian Strain *Penicillium citrinum* Cultured in a Simple and Inexpensive Medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 66, p. 185-195, 1997.

PIMENTEL, M.C.B.; KRIEGER, N.; COELHO, L.C.C.B.; FONTANA, J.D.; MELO, E.H.M.; LEDINGHAM, W.M.; LIMA-FILHO, J.L. Lipase from a Brazilian Strain of *Penicillium citrinum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, p. 59-69, 1994.

PINTO-SOUSA, A.M.; CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. Esther synthesis by a recombinant cutinase in reversed micelles of a natural phospholipid. **Biocatalysis**, v. 9, p. 169-179, 1994.

PIRT, S.J. Principles of Microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications, London, 1975.

POKORNY, D.; FRIEDRICH, J.; CIMERMAN, A. Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus nige*. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 6, p. 363-366, 1994.

PRAZERES, D.M.F.; GARCIA, F.A.P.; CABRAL, J.M.S. Kinetics and stability of a *Chromobacterium viscosum* lipase in a reversed micellar and aqueous media. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v. 53, p. 159-164, 1992.

PRESTRELSKI, S.J.; TEDESCHI, N.; ARAKAWA, T.; CARPENTER, J.F. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. **Biophysical Journal**, v. 65, p. 661-671, 1993.

PRICE, N.C. e DWEK, R.A. **A Química Física em Bioquímica Teoria e Problemas**, Ed. Europa-América, S.d. 1978.

RAO, A.M.; MURRAY, M.A.; JOHN, V.T. Characteristics of lipase catalysis during ester synthesis in reversed micellar system. **Biocatalysis**, v. 4, p. 253-264, 1991.

RATHI, P.; BRADDOO, S.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R. A hyper-thermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 495-498, 2000.

RAZAK, C.N.A.; SALLEH, A.B.; MUSANI, R.; SAMD, M.Y.; BASRI, M. Some characteristics of lipases from thermophilic fungi isolated from palm oil mill effluent. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**, v. 3, p. 153-159, 1997.

REETZ, M.T.; JAEGER, K.E. Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1-2, p. 3-14, 1998.

REJASSE, B.; MAUGARD, T.; LEGOY, M.D. Enzymatic procedures for the synthesis of water-soluble retinol derivatives in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 2, p. 312-320, 2003.

RODRIGUES, Á.R.; CABRAL, M.S.J.; TAIPA, Â. Immobilization of *Chromobacterium viscosum* lipase on Eudragit S-100: coupling, characterization and kinetic application in organic and biphasic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 1-2, p. 133-141, 2002.

ROY, A.; CHAWLA, H.P.S. Biocatalysis in organic solvents: a process for multigram synthesis of 1,4:3,6-dianhydro-D-glucitol 2-acetate and its isomeric 5-acetate using immobilized lipase from *Pseudomonas* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 8-9, p. 490-490, 2001.

RU, M.T.; DORDICK, J.S.; REIMER, J.A.; CLARK, D. Optimizing the salt-induced activation of enzymes in organic solvents. **Biotechnology Bioengineering**, v. 63, p. 233-241, 1999.

SALIS, A.; SOLINAS, V.; MONDUZZI, M. Wax esters synthesis from heavy fraction of sheep milk fat and cetyl alcohol by immobilised lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 21, n. 4-6, p. 167-174, 2003.

SARDA L.; DESNUELLE P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, p. 513-521, 1958.

SAXENA, R.K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; SHEBA, W.D. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, n. 1, p. 1-18, 2003.

SCHRAG, J.D.; CYGLER, M. Lipases and  $\alpha/\beta$  hidrolases fold. *Methods Enzymology*, 284, A, Academic Press, 1997.

SEBASTIÃO, M.J.C. **Estudo de Síntese de Ácidos Graxos por Lipases Microencapsuladas**. Lisboa, 1991. 125 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa.

SECUNDO, F.; CARREA, G. Lipase activity and conformation in neat organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 93-102, 2002.

SELLEK, G.A.; CHAUDHURI, J.B. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 6, p. 471-482, 1999.

SHIMADA, Y.; KOGA, C.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TAKADA, N.T.; TSUMASAWA, S.; TOMINAGA, Y. Purification and characaterization of a novel solvent-tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, p. 349-352, 1993.

SHIPOVSKOV, S.; FERAPONTOVA, E.; RUZGAS, T.; LEVASHOV, A. Stabilisation of tyrosinase by reversed micelles for bioelctrocatalysis in dry organic media. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1620, n. 1-3, p. 119-124, 2003.

SIMON, L. M.; LÁSZLÓ, K.; VÉRTESI, A.; BAGI, K.; SZAJÁNI, B. Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 4, n. 1-2, p. 41-45, 1998.

SMITH, R.E.; LUISI, P.L. Micelar solubilization of biopolymers in hydrocarbon solvents. III. Empirical definition of an acidity scale in reverse micelles. **Helvetica Chimica Acta**, v. 63, p. 2302-2311, 1986.

STAMATIS, H.; XENAKIS, A.; KOLISIS, F.N. Bioorganic reactions in microemulsions; the case of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 4-5, p. 293-318, 1999.

STOECKLEIN, W.; SZTAJER, H.; MENGE, U.; SCHMID, R.D. Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1168, n. 2, p. 181-189, 1993.

STUER, W.; JAEGER, K.E.; WINKLER, U.K. Purification of extracellular lipases from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 168, p. 1070-1074, 1986.

SUGIHARA, S.T.; ENOKI, A.; SHIMADA, Y.; NAGAO, T.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of lipase from *Pichia burtoni*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 277-281, 1995.

SUGIHARA, A.; TANI, T.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. **Journal of Biochemistry**, v. 109, n. 2, p. 211-216, 1991.

SUNDARAM, S.T.; ZHANG, Y.Z.; SHARMA, A.; BRODMAN, B.W. Screening for the involvement of the hydroxyl radical in the biodegradation of glyceryl trinitrate by *Penicillium corylophilum* Dierckz. **Waste Management**, v. 17, n. 7, p. 437-441, 1997.

SUZUKI, T.; NAKAYAMA, T.; KURIHARA, T.; NISHINO, T.; ESAKI, N. Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strain no. 6. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 2, p. 144-148, 2001.

SVENSSON, M.; REES, G.D.; ROBINSON, B.H.; STEPHENSON, G.R. Phospholipid-stabilised water-in-oil microemulsions: A study of ester synthesis by *Humicola lanuginosa* lipase. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 8, n. 1-2, p. 101-111, 1996.

SZTAJER, H.; LÜNSDORF, H.; ERDMANN, H.; MENGE, U.; SCHMID, R. Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. **Biochimica et Biophysica**, v. 1124, p. 253-261, 1992.

SZTAJER, H.; MALISZEWSKA, I. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 8, p. 895-898, 1989.

TAN, T.; WANG, F.; ZHANG, H. Preparation of PVA/chitosan lipase membrane reactor and its application in synthesis of monoglyceride. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 18, n. 4-6, p. 325-331, 2002.

THAMMARAT, A.; NARONGSAK, C. Crystal structure of  $\beta$ -cyclodextrin-benzoic acid inclusion complex. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 5, p. 439-446, 2003.

TILBEURGH, H.; SARDA, L.; VERGER, R.; CAMBILLAU, C. Structure of the pancreatic lipase-procolipase complex, **Nature**, v. 362, p. 814-820, 1993.

TWEDDELL, R.J.; KERMASHA, S.; COMBES, D.; MARTY, A. Esterification and Interesterification Activities of Lipases from *Rhizopus niveus* and *Mucor miehei* in Three Different Types of Organic Media: A Comparative Study. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 6, p. 439-445, 1998.

UNDURRAGA, D.; MARKOVITS, A.; ERAZO, S. Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction. **Process Biochem**, v. 36, p. 933–939, 2001.

VAYSSE, L.; LY, A.; MOULIN, G.; DUBREUCQ, E. Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 5, p. 648–655 2002.

VENKATESHWARIU, N.; REDDY, S.M. Production of lipase by thermophilic fungi. **Indian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 119–124, 1993.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32–38, 1997.

VERGER, R. Enzyme Kinetics of Lipolysis. **Methods in Enzymology**, v. 64, p. 340–392, D.L. Purich (Ed.), Academic Press Inc, New York, 1980.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113–148, 2000.

VITOLO, M. Imobilização de Enzimas. LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**, vol.3 Processos Fermentativos e Enzimáticos. São Paulo-SP: Edgard Blücher LTDA, 2001, p. 391–403.

VULSON, E. Industrial applications of lipases. **In: Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application**, 271–288. Wooley, P. and Petersen, S.B. Cambridge University, G.B., 1994.

WACKETT, L.P.; HERSHBERGER, C.D. General Concepts in Biodegradation and Biocatalysis. **In: WACKETT, L.P.; HERSHBERGER, C.D. Biocatalysis and Biodegradation: Microbial Transformation of Organic Compounds**. Washington, D.C.: ASM Press, 2001. p. 1–5.

WANG, Y.; SRIVASTAVA, K.C.; SHEN, G.J.; WANG, H.Y. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain, A30-1 (ATCC 53841). **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 8, n. 79, p. 433–438, 1995.

WATANABE, T.; MATSUE, R.; HONDA, Y.; KUWAHARA, M. Differential activities of a lipase and a protease toward straight- and branched-chain acyl donors in transesterification to carbohydrates in an organic medium. **Carbohydrate Research**, v. 275, n. 1, p. 215–220, 1995.

WATANABE, Y.; MIYAWAKI, Y.; ADACHI, S.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R. Equilibrium constant for lipase-catalyzed condensation of mannose and lauric acid in water-miscible organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 8–9, p. 494–498, 2001.

WEHTJE, E.; COSTES, D.; ADLERCREUTZ, P. Enantioselectivity of lipases: Effects of water activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 3, n. 5, p. 221-230, 1997.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

WU, X.Y.; JÄÄSKELÄINEN, S.; LINKO, Y.Y. An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 226-231, 1996.

XU, Y.; WANG, D.; MU, X.Q.; ZHAO, G.A.; ZHANG, J.C. Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinesis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 18, n. 1-3, p. 29-37, 2002.

ZAIDI, A.; GAINER, J.L.; CARTA, G.; MRANI, A.; KADIRI, T.; BELARBI, Y.; MIR, A. Esterification of fatty acids using nylon-immobilized lipase in n-hexane: kinetic parameters and chain-length effects. **Journal of Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 209-216, 2002.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A.M. Enzymic catalysis in organic media at 100°C. **Science**, v. 224, p. 1249-1251, 1984.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A.M. The effect of water on enzyme action in organic media. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 8017-8021, 1988.

ZHANG, Y.Z.; SUNDARAM, S.T.; SHARMA, A.; BRODMAN, B.W. Biodegradation of glyceryl trinitrate by *Penicillium corylophilum* Dierckx. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1712-1714, 1997.